



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**  
*Campus Botucatu*

**FACULDADE DE MEDICINA**

**Jacqueline Silva Brito Lima**

**Expressão de fatores de proliferação e  
antiapoptóticos em carcinomas basocelulares**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia como requisito para a obtenção do título de Doutor em Patologia.

Orientador: Prof. Dr. Hélio Amante Miot

Coorientadora: Profa. Dra. Mariângela Esther Alencar Marques

Botucatu – SP

2016

Jacqueline Silva Brito Lima

**Expressão de fatores de proliferação e  
antiapoptóticos em carcinomas basocelulares**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia, da Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” — *Campus* de Botucatu, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Patologia.

Orientador: Prof. Dr. Hélio Amante Miot

Coorientadora: Profa. Dra. Mariângela Esther Alencar Marques

Botucatu - SP  
2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

**Lima, Jacqueline Silva Brito.**

**Expressão de fatores de proliferação e antiapoptóticos em  
carcinomas basocelulares / Jacqueline Silva Brito Lima.**

- Botucatu, 2016

**Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de  
Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu**

**Orientador: Hélio Amante Miot**

**Coorientador: Mariângela Esther Alencar Marques Capes:  
40105008**

1. Apoptose. 2. Carcinoma basocelular. 3. Células -  
Proliferação. 4. Neoplasias.

A **Deus**, pela minha existência, porque nada nos é possível se não for de Sua vontade.

Aos meus pais, **Sônia** e **Hermann** (in memoriam), fontes de sabedoria, energia e equilíbrio, conselheiros dos momentos decisivos, símbolos de paciência e tolerância, meus melhores amigos, mestres e guias da minha formação moral.

Ao meu esposo **Luiz Carlos**, pela tolerância com que encarou as minhas ausências, pela dedicação e espírito de sacrifício consentido durante este período.

Ao meu filho **Hermann**, fonte da minha alegria e da minha vontade de sempre seguir, que muitas vezes teve que suportar minha ausência, falta de carinho e atenção.

Aos meus irmãos, **Kerline** e **Hermann**, cunhados, **Geovane** e **Miriam**, e sobrinhos, **Blanca**, **Emilly**, **Geovane Filho** e **Sônia**, pelo incentivo e por estarem sempre ao meu lado durante todas as etapas da minha vida.

Aos Professores, **Iracilda Maria de Moura Lima**, **Marcos Vinícius Carneiro Vital**, **Mário Ribeiro de Melo Júnior**, **Nicodemos Teles de Pontes Filho**, **Ricardo Luiz Simões Houly** e **Theresinha de Jesus Carvalho Calado**, que, quando deveriam ser simplesmente professores, transmitindo seus conhecimentos e experiências de vida, foram amigos e, em sua amizade, compreenderam-me e incentivaram-me a seguir o melhor caminho.

À **Sônia Carvalho** (in memoriam), secretária da Pós-Graduação em Patologia da UFPE, cuja presença física deixou de existir, mas sua presença espiritual, sempre se manteve forte em meu coração.

**Dedico**

## AGRADECIMENTOS

Ao meu Orientador, **Prof. Dr. Hélio Amante Miot**, que com determinação, seriedade, paciência, competência e vasto conhecimento, contagiou e possibilitou o meu desenvolvimento científico, bem como o desenvolvimento deste trabalho.

À minha Coorientadora, **Profa. Dra. Mariângela Esther Marques**, exemplo de competência e dedicação, pela qualidade impecável da minuciosa análise patológica, pelo entusiasmo e incentivos a mim prestados, toda a minha gratidão.

Aos **Profs. Drs., Nicodemos Teles de Pontes Filho, Mário Ribeiro de Melo Júnior e Márcia Guimarães da Silva**, pela oportunidade junto à parceria CAPES/UFPE/UNESP da realização deste Doutorado institucional.

Aos membros da banca examinadora, **Prof. Dr. Cristiano Claudino de Oliveira, Prof. Dr. Deilson Elgui de Oliveira, Profa. Dra. Gisele Alborghetti Nai e Prof. Dr. Mário Ribeiro de Melo Júnior**, por aceitarem o meu convite para participarem desta comissão examinadora, e pelos contributos, indicando-me os melhores caminhos para o aprimoramento deste trabalho.

Ao **Prof. Dr. Juliano Vilaverde Schmitt**, pela presença na banca de qualificação e pelas observações oportunas que tanto contribuíram para melhorias na tese.

Às **Profas. Dras., Iracilda Maria de Moura Lima e Theresinha de Jesus Carvalho Calado**, exemplos de sabedoria, dedicação, seriedade, ética e, sobretudo, de amor pela profissão, agradeço aos seus ensinamentos que tanto me nutriram a trajetória, por acreditarem em mim e me enriquecerem com suas presenças e seus saberes.

Ao **Prof. Ricardo Luiz Simões Houly**, que muito me marcou desde os bancos universitários, pela competência, pela paixão de ensinar, humanismo no trato de seus pacientes e alunos, pelo apoio, incentivo, disponibilidade e demonstração de amizade, pelo valioso empenho e ajuda na análise anatomopatológica, de forma minuciosa e criteriosa. E à sua esposa, **Auta Maria Macêdo Houly**, bióloga, pelas sugestões criteriosas e ensinamentos no desenvolvimento deste estudo.

Ao **Prof. Dr. Marcos Vinícius Carneiro Vital**, pela gentileza e disponibilidade na ajuda à interpretação dos dados encontrados, decisivas para a construção de uma análise crítica dos resultados.

Aos meus “anjos da guarda”, **Vânia Soler, Marcos Franchi, Marluci Betini, e Alberto Capelluppi**, pelas ajudas e sugestões que sempre me traziam luz, embora tantas dificuldades, sempre estiveram ao meu lado.

Aos colegas da disciplina de Anatomia Humana da Universidade Federal de Alagoas (UFAL), **Amauri Clemente da Rocha, Amundson Portela Holanda Cavalcanti, Camila de Albuquerque Melo de Carvalho, Célio Fernando de**

**Sousa Rodrigues, Christiane Cavalcante Feitoza, Daniele Gonçalves Bezerra, Fernando José Camello de Lima, Fernando Wagner da Silva Ramos, Francisco Carlos Pereira, Jorge Pereira Guedes, Luiz Carlos Buarque de Gusmão e Thays Cristine Ferro Wanderley**, com os quais sempre mantive uma convivência saudável, e que no momento do meu afastamento, tudo fizeram para tornar possível a conclusão deste trabalho.

Ao **Divino Ferreira Neto**, Residente em Patologia do Hospital Universitário Prof. Alberto Antunes (HUPAA), e à **Jacqueline Correa**, acadêmica bolsista Cnpq da Universidade Federal de Alagoas (UFAL), pela amizade, competência e disponibilidade em ajudar nas análises das lâminas.

À **Janete Honorato** pelo comprometimento em fazer o melhor pelos alunos do Programa de Pós-Graduação.

À **Rosemary Cristina da Silva**, bibliotecária da UNESP, pelo carinho e pela presteza com que me atendeu, demonstrando competência e dedicação na execução do exercício profissional, principalmente no que tange à organização das referências bibliográficas.

À **Taís de Almeida Firmino** e à **Diva Aparecida Rodrigues**, assistentes de suporte acadêmico da UNESP, cuja eficiência evidenciou-se no desenvolvimento deste trabalho, através do levantamento bibliográfico.

Ao **Carlos César Ramos, Luciano Donini e Luiz Fernando Franchi**, profissionais do laboratório de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, pela colaboração indispensável no processamento das lâminas e pela amizade inestimável.

Aos funcionários do departamento de Dermatologia, em especial, **Levi Pascoal**, pela generosidade da acolhida, que sempre me receberam prestativamente.

Aos meus amigos da Pós-Graduação, **Denise, Lilian, Luciana, Moisés, Sandra e Tássia**, pela oportunidade de convivência salutar.

Aos amigos **Talysson Ramos e Jessika Souza**, por terem dado apoio e suporte na área de informática e por estarem sempre presentes quando precisei.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**) e ao Fundo de Apoio à Dermatologia de São Paulo (**FUNADERSP**), pelo apoio financeiro.

## Resumo

O carcinoma basocelular (CBC) é a neoplasia maligna mais comum entre os homens e sua incidência está aumentando em nosso meio. Pode se manifestar como lesão nodular, superficial, esclerodermiforme, micronodular e fibroepitelioma de Pinkus. O CBC é um carcinoma de baixa mortalidade, porém com elevada morbidade devido ao potencial destrutivo local e às elevadas taxas de reincidência. As diferenças evolutivas dos diversos tipos de carcinomas basocelulares não são bem definidas. A análise de fatores de proliferação e apoptose pode subsidiar o conhecimento sobre a fisiopatologia e as diferenças evolutivas dessas lesões. A literatura revela a escassez de investigações sobre a expressão diferencial de fatores de proliferação (Ki-67) e relacionados à apoptose (p53, survivina e NF- $\kappa$ B-p105) dos diferentes subtipos de carcinomas basocelulares e ainda tumores recidivados. O objetivo desse estudo é avaliar a expressão de marcadores de proliferação celular e apoptose em carcinomas basocelulares dos tipos nodular, superficial, esclerodermiforme e tumores recidivados. Foram selecionados subtipos histológicos únicos, como forma de tentar compreender o comportamento dos CBCs individualmente. As lâminas desses espécimes foram submetidas ao protocolo de marcação imuno-histoquímica. Foram estudadas 100 amostras, sendo 50 unidades de epiderme normal e as demais distribuídas entre cada subtipo tumoral. O padrão de marcação de cada marcador sobre os diferentes tipos de tecidos foi avaliado a partir de modelos lineares generalizados (GLMs) seguidos de teste post-hoc de Sidak, quando necessário. Foram encontradas diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,01$ ) na imunomarcação de diferentes tipos de tecidos para os marcadores Ki-67, p53 e survivina, mas não para o marcador p105 ( $p = 0,21$ ). O marcador Ki-67 foi mais expresso nos esclerodermiformes que em células da epiderme e nos nodulares. A imunomarcação do p53 foi menos expressa na epiderme que nos subtipos superficiais e nas recidivas, e também menos expressa nos esclerodermiformes que em todos os outros subtipos tumorais. A survivina mostrou uma imunomarcação maior na epiderme em relação aos subtipos tumorais estudados. A comparação entre os diferentes marcadores foi avaliada pelo coeficiente de correlação de Spearman, que detectou uma correlação estatisticamente significativa ( $p < 0,01$ ) entre os marcadores, Ki-67 e p53 na imunomarcação dos subtipos estudados e de células da epiderme, e uma correlação entre Ki-67 e survivina quando consideramos apenas as células tumorais. Neste estudo, a expressão simultânea de marcadores permitiu a identificação de padrões de proliferação e apoptose que individualizaram comportamentos em subtipos de CBCs, em consonância com formas recidivadas, e de forma independente na epiderme. Houve diferentes padrões de correlação entre a expressão dos marcadores dos CBCs e da epiderme.

**Palavras Chaves:** carcinoma basocelular, apoptose, proliferação, neoplasia.

## Abstract

Basal cell carcinoma (BCC) is the most common malignant neoplasm among men and its incidence is increasing in our country. It can manifest as nodular, superficial, sclerodermiform, micronodular and Pinkus fibroepithelioma lesions. BCC is a low-mortality carcinoma, but with high morbidity due to local destructive potential and high rates of recurrence. The evolutionary differences of the various types of basal cell carcinomas are not well defined. The analysis of proliferation and apoptosis factors may support knowledge about the pathophysiology and evolutionary differences of these lesions. The literature reveals the scarcity of investigations on the differential expression of proliferation factors (Ki-67) and related apoptosis (p53, survivin and NF- $\kappa$ B-p105) of the different subtypes of basal cell carcinomas and recurrent tumors. The aim of this study is to evaluate the expression of markers of cell proliferation and apoptosis in basal cell carcinomas of the nodular, superficial, sclerodermiform and recurrent tumors. Unique histological subtypes were selected as a way to attempt to understand the behavior of individual BCCs. The slides of these specimens were submitted to the immunohistochemical labeling protocol. A total of 100 samples were studied, being 50 normal epidermal units and the others distributed between each tumor subtype. The marking pattern of each marker on the different tissue types was evaluated from generalized linear models (GLMs) followed by Sidak post-hoc test, when necessary. Statistically significant differences ( $p < 0.01$ ) in the immunostaining of different tissue types were found for the Ki-67, p53 and survivin markers, but not for the p105 marker ( $p = 0.21$ ). The Ki-67 marker was more expressed in sclerodermiform than in epidermal and nodular cells. Immunoblotting of p53 was less expressed in the epidermis than in superficial subtypes and relapses, and also less expressed in sclerodermiform than in all other tumor subtypes. Survivin showed a greater immunostaining in the epidermis with respect to the tumor subtypes studied. The comparison between the different markers was evaluated by the Spearman correlation coefficient, which detected a statistically significant correlation ( $p < 0.01$ ) between the markers, Ki-67 and p53 in the immunoblotting of the studied subtypes and epidermal cells, and one correlation between Ki-67 and survivin when we considered only tumor cells. In this study, the simultaneous expression of markers allowed the identification of patterns of proliferation and apoptosis that individualized behaviors in subtypes of BCCs, in consonance with relapsed forms, and independently in the epidermis. There were different patterns of correlation between the expression of BCC and epidermal markers.

**Keywords:** Basal cell carcinoma, apoptosis, proliferation, neoplasm.

## Lista de Figuras

<b>Figura 1</b> - Carcinoma basocelular (nodular) na asa do nariz. ....	24
<b>Figura 2</b> - Monócitos periféricos no 13º dia de cultura. ....	37
<b>Figura 3</b> - Esquema dos sistemas intrínseco e extrínseco de apoptose .....	43
<b>Figura 4</b> - Sinais que ativam a senescências .....	45
<b>Figura 5</b> - . Ativação do programa de senescência por diferentes estímulos em células humanas.....	46
<b>Figura 6</b> - Via de ativação do NF-kB.....	52
<b>Figura 7</b> - Procedimentos histológicos.....	58
<b>Figura 8</b> - Fotomicrografias das imunomarcações do carcinoma basocelular. ....	61
<b>Figura 9</b> - Expressão do marcador Ki-67. ....	78
<b>Figura 10</b> - Expressão do marcador p53. ....	80
<b>Figura 11</b> - Expressão do marcador Survivina Nuclear. ....	82
<b>Figura 12</b> Expressão do marcador Survivina Citoplasmática. ....	84
<b>Figura 13</b> - Expressão do marcador p105. ....	86
<b>Figura 14</b> Razão entre as expressões de Ki-67 e p53. ....	88
<b>Figura 15</b> Razão entre as expressões de Ki-67 e Survivina Nuclear. ....	90
<b>Figura 16</b> - Mapa perceptual de Correspondência Múltipla. ....	93

## Lista de Tabelas e de Apêndices

<b>Tabela 1</b> - Característica dos indivíduos da amostra. ....	69
<b>Tabela 2</b> - Número de unidades amostrais obtidas para cada tipo de célula utilizada. ....	74
<b>Tabela 3</b> Mediana e quartis dos valores de respostas dos marcadores utilizados. ....	75
<b>Tabela 4</b> - Resultados dos testes <i>post-hoc</i> de Sidak sequencial, comparando as expressões do marcador Ki-67. ....	77
<b>Tabela 5</b> - Resultados dos testes <i>post-hoc</i> de Sidak sequencial, comparando as expressões do marcador p53. ....	79
<b>Tabela 6</b> - Resultados dos testes <i>post-hoc</i> de Sidak sequencial, comparando as expressões do marcador Survivina Nuclear. ....	81
<b>Tabela 7</b> - Resultados dos testes <i>post-hoc</i> de Sidak sequencial, comparando as expressões do marcador Survivina Citoplasmática. ....	85
<b>Tabela 8</b> - Resultados dos testes <i>post-hoc</i> de Sidak sequencial, comparando as expressões do marcador p105. ....	85
<b>Tabela 9</b> - Resultados dos testes <i>post-hoc</i> de Sidak sequencial, comparando a razão entre as expressões de Ki-67 e p53. ....	87
<b>Tabela 10</b> Resultados dos testes <i>post-hoc</i> de Sidak sequencial, comparando a razão entre as expressões de Ki-67 e Survivina Nuclear. ....	89
<b>Tabela 11</b> Matriz de correlação de Spearman entre os marcadores considerando todos os tipos de células. ....	91
<b>Tabela 12</b> - Matriz de correlação de Spearman entre os marcadores considerando apenas as células de Epiderme. ....	92
<b>Tabela 13</b> - Matriz de correlação de Spearman entre os marcadores considerando apenas as células tumorais. ....	92
<b>Apêndice 1</b> - Detalhamento da Técnica de Imuno-histoquímica. ....	115
<b>Apêndice 2</b> - Autorização do Comitê de Ética em Pesquisa. ....	117

## Sumário

1. Introdução.....	14
2. Revisão da Literatura.....	17
<b>2.1 Epidemiologia</b> .....	17
<b>2.2 Etiologia</b> .....	20
<b>2.3 Aspectos morfológicos</b> .....	23
2.3.1 <i>Formas Clínicas de CBC</i> .....	25
<b>2.4 Classificação Histopatológica</b> .....	28
<b>2.5 Biologia do câncer de pele</b> .....	31
<b>2.6 Proliferação Celular</b> .....	33
<b>2.7 Apoptose</b> .....	35
2.7.1 <i>Vias de apoptose</i> .....	37
2.7.2 <i>Resistência à apoptose em tumores</i> .....	42
<b>2.8 Senescência</b> .....	45
<b>2.9 Marcadores biológicos</b> .....	48
2.9.1 Ki-67.....	49
2.9.2 p53.....	50
2.9.3 NF-kB (p105).....	51
2.9.4 Survivina.....	53
3. Objetivos.....	55
4. Materiais e Métodos.....	57
<b>4.1 Técnica de Imuno-histoquímica</b> .....	59
<b>4.2 Análise estatística dos dados</b> .....	65
5. Resultados.....	68
<b>5.1 Expressão do Ki-67</b> .....	76
<b>5.2 Expressão do p53</b> .....	78
<b>5.3 Expressão da Survivina Nuclear</b> .....	80
<b>5.4 Expressão da Survivina Citoplasmática</b> .....	82
<b>5.5 Expressão do p105</b> .....	84
<b>5.6 Razão entre as expressões de Ki-67 e p53</b> .....	86
<b>5.7 Razão entre as expressões de Ki-67 e Survivina Nuclear</b> .....	88
<b>5.8 Correlações entre os marcadores</b> .....	90
<b>5.9 Análise de Correspondência Múltipla</b> .....	93
6. Discussão.....	95

<b>6.1 Considerações</b> .....	99
7. Conclusão.....	102
8. Referências .....	104
9. Apêndices .....	115
<b>9.1: Detalhamento da Técnica de Imuno-histoquímica</b> .....	115
9.1.1 Preparação das amostras .....	115
9.1.2 Recuperação Antigênica.....	115
9.1.3 Desparafinização .....	116
9.1.4 Reação de Imuno-histoquímica Automatizada .....	116
<b>9.2: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa</b> .....	117

## ***1. Introdução***

## 1. Introdução

O carcinoma basocelular (CBC) é considerado a neoplasia maligna mais comum em humanos, principalmente, em pessoas de pele clara (Rubinet *et al.*, 2005). Também é a mais comum entre os cânceres de pele: 8 em cada 10 casos dos tumores cutâneos (ACS, 2016). Estima-se que, anualmente, ocorrem cerca de 750.000 novos casos em todo o mundo (Dessinioti *et al.*, 2010; ACS, 2016).

Esse tipo de tumor cutâneo se destaca por sua alta morbidade e baixa mortalidade, comportamento invasivo local de baixa agressividade, com crescimento lento e baixo potencial metastático, podendo cursar com múltiplas recorrências. No entanto, para uma minoria dos casos, observa-se um comportamento biológico agressivo, com extensa destruição tissular, ou, raramente provocando metástases (Crowson, 2006; Jacobs *et al.*, 1982).

A erradicação do CBC requer excisão cirúrgica, o que pode levar a deformidades funcionais e cosméticas, morbidade e até, mais raramente, mortalidade, gerando elevação significativa de despesas com assistência médica e hospitalar (Ishiet *et al.*, 2004). Assim, em consequência de sua alta incidência, o CBC, embora eminentemente curável quando o diagnóstico é feito prontamente e a lesão tratada em sua fase inicial, constitui um enorme fardo financeiro no sistema de saúde (Crowson, 2006).

O registro crescente de número de casos novos de CBC e também de casos recorrentes, tem sido feito visando determinar as variáveis e respectivos parâmetros com significado prognóstico na predição dos tumores com comportamento mais agressivo, os quais podem recorrer e causar metástases (Crowson, 2006; Nasser, 2005).

Dentre estes, têm se destacado os relacionados à histogênese, utilizando técnicas de Genética e Biologia Molecular, associados às avaliações histomorfológicas em inquéritos epidemiológicos, os quais têm permitido a identificação de fatores de risco para o desenvolvimento de lesões mais agressivas e com maior potencial de recorrência (Learet *et al.*, 1998); a proposição de métodos mais eficazes de prevenção (Maia *et al.*, 1995); e o avanço em termos de novas propostas terapêuticas que minimizem os custos e o dano estético (Rubinet *et al.*, 2005; Sousa *et al.*, 2004).

A compreensão das alterações morfofuncionais que ocorrem no processo de transformação neoplásica tem sido atingida ao se complementar os estudos histológicos e morfológicos do CBC, com marcadores biológicos utilizados em técnicas de imuno-histoquímica (IHQ) (Sousa *et al.*, 2004).

A realização de estudos desse porte que visam explicar o comportamento biológico das neoplasias, podem auxiliar tanto na escolha do tratamento como no desenvolvimento de novos fármacos, com especificidade para moléculas celulares facilitadoras da propagação tumoral (Sousa *et al.*, 2004).

Nesse sentido, o conhecimento dos mecanismos apoptóticos e de proliferação celular, enquanto fenômenos biológicos, passam a ser uma necessidade no controle de diversos processos vitais, incluindo aqueles associados a patologias como o CBC (Grivicich *et al.* 2007).

Vários fatores têm sido associados ao comportamento biológico desse tumor, incluindo o tipo histopatológico, a profundidade da invasão tumoral, a invasão perineural e a expressão de diversos marcadores biológicos (Kramer *et al.*, 2014).

Partindo desses pressupostos, este estudo pretende determinar se as atividades proliferativa e apoptótica explicam o comportamento biológico dos diferentes subtipos de CBC, sabendo-se que esses tumores têm comportamento muito indolente, raramente metastático, com invasividade local. Como sua malignidade é pouco evidente, a técnica a ser utilizada prevê a comparação com epiderme adjacente utilizado como padrão de expressão na condição de contraprova para a determinação das características de malignidade da região tumoral.

Diante do exposto, este estudo se propõe a identificar a expressão diferencial do fator de proliferação Ki-67, e dos fatores associados à apoptose p53, survivina e NF-kB, a partir da análise e avaliação da expressão desses marcadores em carcinomas basocelulares dos tipos considerados mais comuns: nodular, superficial e esclerodermiforme, e em tumores recidivados.

## ***2.Revisão da Literatura***

## **2.Revisão da Literatura**

O estudo do carcinoma basocelular (CBC) requer o conhecimento de vários conteúdos, desde aspectos epidemiológicos e etiológicos até a compreensão dos fenômenos biológicos envolvidos neste tipo de tumor.

### **2.1 Epidemiologia**

Carcinoma basocelular, câncer de pele não melanoma, é a neoplasia cutânea maligna mais prevalente nos Estados Unidos, com uma incidência estimada que tem variado entre 600.000 e 900.000 casos por ano (McKee *et al.*, 2005). Depois de um aumento na incidência de cerca de 20% entre 1971 e 1977, em 1998, atingiu-se a marca de, aproximadamente, um milhão de novos casos (Crowson, 2006).

Situação mais preocupante, em termos de crescimento no número de casos, foi registrada no Reino Unido, onde a incidência de carcinoma basocelular aumentou 238%, em 14 anos (Goldberg, 1996). Um valor ligeiramente inferior foi relatado na Europa do Norte, em contraste com uma incidência drasticamente aumentada na Austrália (McKee *et al.*, 2005). Esses casos demonstram que a incidência varia de região para região.

No Brasil, também é o tipo de câncer mais frequente, pois representa 30% de todos os tumores malignos registrados no país. Apresenta altos percentuais de cura, se for detectado precocemente. Cabe destacar que, entre os tumores de pele, o tipo não melanoma apesar de ser o de maior incidência e apresenta a mais baixa mortalidade (INCA, 2016).

O número de casos novos de câncer de pele não melanoma, no Brasil, estimados pelo “Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva”, para 2006 foi de 55.480 casos em homens e de 61.160 em mulheres considerando-se um total de 116.640 (INCA, 2003), ou seja, 47,6% para homens e 52,4% para mulheres.

A variação também ocorre entre os sexos: os homens são afetados mais frequentemente que as mulheres, independentemente da idade (Kopke e Schmidt, 2002). Baseado em um estudo de 1994, a incidência estimada de carcinoma basocelular nos Estados Unidos variou entre os dois grupos: 407/100,000 para homens; e 212/100,000 para mulheres. Em todos os casos, há, quase sempre, uma história de exposição excessiva ao sol, geralmente até os 20 anos (Goldberg, 1996).

Em relação ao número de mortes, informações do Sistema de Informação sobre Mortalidade (SIM) do Ministério da Saúde, revelam uma inversão praticamente simétrica: num total de 1.769 óbitos, são previstos 1.000 homens e 769 mulheres (56% de mortes masculinas contra 44% de femininas) (SIM, 2013).

Em 2016 essa estimativa de novos casos já supera essa informação, ou seja, um total de 175.760, distribuídos assim: 80.850 em homens e 94.910 para mulheres (INCA, 2016), ou seja 46% para homens e 54% em mulheres. Indicando aumento na incidência de 50% em 10 anos.

Em climas menos quentes, o CBC representa um tumor característico da terceira idade, e até recentemente, considerava-se estar comumente presente em pacientes a partir da sexta década de vida. No entanto, esse limite etário tem

diminuído, e, atualmente, instituições como o INCA, já reconhecem que o câncer de pele tem sido mais comum em pessoas com mais de 40 anos (INCA, 2016).

O CBC, em climas tropicais, onde há maior incidência de raios solares (raios ultravioleta – RU), pode apresentar-se em pacientes muito jovens, e até mesmo em crianças sem doenças genéticas associadas (Mckee *et al.*, 2005).

A ocorrência familiar de outro câncer de pele parece ser um fator importante na incidência do CBC. Alguns artigos chamam a atenção para a maior frequência de outros tipos de tumores malignos em pacientes portadores de CBCs, quando se compara à população geral, entre eles Mckee *et al.* (2005).

Em relação às recidivas, o risco cumulativo em três anos, de um paciente portador de CBC vir a ter outro basocelular, é de, aproximadamente, 44%, valor que representa cerca de 10 vezes mais que o da população geral. Esse comportamento justifica a necessidade de acompanhamento periódico de pacientes ditos "curados", depois de tratamentos cirúrgicos para essa enfermidade (Kopke Schmidt, 2002).

Incidência aumentada de CBCs tem sido notada em pacientes imunodeprimidos, como os portadores de HIV ou aqueles que estejam em tratamento com imunossupressores (Kopke Schmidt, 2002; Silverberg *et al.*, 2013).

## **2.2 Etiologia**

O CBC é um tumor de crescimento lento, ocorrendo apenas no epitélio escamoso. Surge pela transformação de células estaminais basais localizadas nos folículos pilosos da epiderme ou da camada basal. Não há lesão precursora conhecida e raramente metastatiza(Goldberg, 1996).

As lesões ocorrem tanto em pele protegida quanto nas áreas expostas ao sol, mas muitas vezes,têm uma biologia e morfologia diferentes em cada um desses locais. Tipicamente, os CBCs ocorrem na quarta década de vida e, embora exceções possam ocorrer, pacientes com fenótipos de pele clara e albinos, com sardas; olhos azuis; cabelos ruivos (sensíveis à ação dos raios solares); ou aqueles cujo trabalho ou atividades de lazer os levam à exposição solar pronunciada e prolongada, são particularmente predispostos a essa patologia (Crowson,2006, INCA 2016).

No entanto, o número significativo de CBCs em áreas do corpo não expostas ao sol sugere que outros fatores de risco possam desempenhar um importante papel no desenvolvimento dos tumores (Tilli *et al.*, 2005). Apesar de a luz ultravioleta (UV) ser o fator mais importante no desenvolvimento e progressão dos CBCs, fatores de risco adicionais incluem as seguintes situações de exposição: (1) a arsênico; (2) a derivados de alcatrão; e (3) à irradiação (Crowson, 2006).

Estudos epidemiológicos têm sugerido que o início da carcinogênese ocorre logo após o período de exposição ao sol em torno da idade de 20 anos (pois a exposição geralmente continua), manifestando-se como CBC 40 a 60 anos

após esse período (ou seja na idade entre 60 e 80 anos): a exposição à luz solar irá induzir alterações no DNA das células epidérmicas, e seletivamente, suprimir o sistema imunológico e a capacidade do corpo para procurar e destruir células alteradas (apoptose), com capacidade de formar tumores(Goldberg, 1996).

Deve-se salientar que, com a idade avançada, torna-se reduzida a capacidade de os danos ao DNA (induzidos pela luz solar) serem reparados, embora alguns pacientes mais jovens possam apresentar comprometimento na capacidade para reparar alterações no DNA induzidas pela luz solar (Goldberg, 1996).

Esse mesmo autor, afirma que a exposição à radiação ultravioleta (RUV), especificamente UVB, induz ligações covalentes no DNA entre pirimidinas adjacentes, gerando fotoprodutos, tais como, dímeros ciclodipirimidina (T/T) e lesões de pirimidina que são mutagênicas se não forem reparadas. Ao contrário, UVB e UVA podem ter efeitos mais indiretos no DNA através do ROS. RUV também é um imunossupressor local na pele, sugerindo que isso pode comprometer a atividade antitumoral local (Goldberg, 1996). Assim, a resposta da pele (tipo de pele) à queimadura e bronzeamento, é importante na determinação do risco de carcinoma basocelular.

Polimorfismo no receptor de melanocortina (MC1R ou melanocortina-1) tem sido fortemente associado com o tipo de pele. Estudos sugerem que variantes do gene sejam um importante fator de risco independente para o câncer de pele não melanoma (CPNM) (Goldberg, 1996).

Apesar de a luz solar ser o principal fator carcinogênico para os CBCs, ainda não foram determinados quais comprimentos de onda da luz solar que provocam a sua formação; não se encontra estabelecida a duração da exposição, bem como a dose total de radiação; e até a década de 1990, ainda não existia um modelo animal para os estudos *in vivo* sobre o CBC (Goldberg, 1996). No entanto, a partir do final dessa década, com o surgimento de linhagens de camundongos transgênicos que expressam a proteína *smoothened* nos tecidos, e que, além de apresentarem múltiplos CBCs, também simulam a síndrome do nevo basocelular - apresentam diversas alterações ósseas (Oro *et al.*, 1997; Cobourne *et al.*, 2009; Tang *et al.*, 2012).

O carcinoma basocelular pode, assim como o carcinoma de células escamosas, surgir em cicatrizes, seios de drenagem, úlceras, queimaduras locais e em focos de inflamação crônica (Crowson, 2006), ou sejam portadores de doenças cutâneas prévias também se incluem entre as principais vítimas, inclusive crianças e negros (INCA, 2016).

No caso de pacientes imunodeprimidos, o papel do comprometimento imunitário em promover um aumento do risco de carcinoma basocelular pode ser devido à uma diminuição da vigilância imunológica a vírus oncogênicos (Crowson, 2006, Silverberg *et al.*, 2013).

As genodermatoses que aumentam o risco de carcinoma basocelular incluem a xerodermapigmentosa, síndrome de Rasmussen, síndrome de Rombo, síndrome de Bazex-Christol-Dupre, albinismo, doença de Darier, e síndrome do nevo basocelular. Estas síndromes diminuem a pigmentação da epiderme e, assim, aumentam o risco de transformação induzida pela luz ultravioleta ou

oncogênica promovendo instabilidade genotípica na epiderme (Crowson, 2006, Valiati *et al.* 2009).

### **2.3 Aspectos morfológicos**

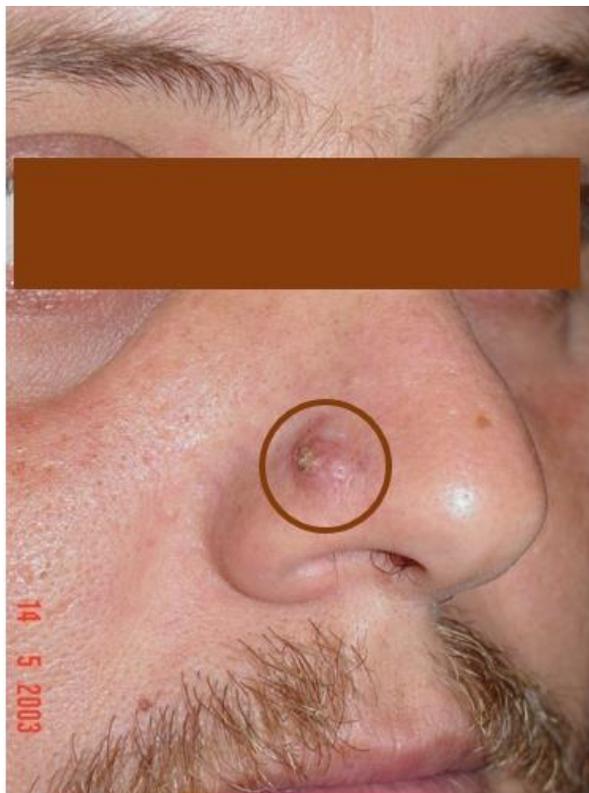
A pele, maior órgão do corpo humano, é uma superfície heterogênea, fato que justifica o câncer de pele não melanoma poder apresentar tumores de diferentes tipos, sendo registrados dois tipos mais comuns: o carcinoma basocelular, menos agressivo e mais incidente; e o carcinoma epidermóide (INCA, 2016).

Por serem as áreas mais cronicamente expostas, a face, o dorso das mãos, os ombros e o couro cabeludo (nos homens com alopecia androgenética), são as mais comumente acometidas por CBCs (ACS, 2016).

Fenótipos caucasianos e, além da pele clara, a presença de efélides, olhos claros (azul-verde), cabelos loiros ou ruivos indicam os indivíduos de maior risco (ACS, 2016). O basocelular é raro em negros e entre os orientais (Kopke e Schmidt, 2002).

O carcinoma basocelular típico é uma pápula rosa perolada ou avermelhada com telangiectasia. As lesões podem ser translúcidas ou ligeiramente eritematosas com uma borda enrolada, algumas vezes acompanhadas por escamação, hemorragia ou formação de crostas (Fig. 1) (Crowson, 2006). Tumores de crescimento agressivo tendem a mostrar ulceração

mais frequente e de grande porte, podendo ser destrutiva de olhos, ouvidos e narinas (Crowson, 2006).



**Figura 1.** Carcinoma basocelular (nodular) na asa do nariz. (Fonte: Hélio Amante Miot, 2003).

Os diferentes subgrupos histomorfológicos têm suas correlações clínicas específicas; nas variantes de crescimento agressivo como infiltrativa, o carcinoma basocelular manifesta-se como uma placa escariforme deprimida, enquanto a variante superficial apresenta-se como uma placa avermelhada, com despigmentação variada, e uma margem difusa e/ou periférica, ou uma cicatriz atrófica tipo periférica. As lesões superficiais são frequentemente multifocais

(câncer chamado "fogo de campo" da célula basal). A variedade linear na infância e adolescência se manifesta como um arranjo longitudinal (Crowson, 2006).

Ao exame histológico, as células tumorais lembram as da camada basal da epiderme. Elas surgem a partir da epiderme ou do epitélio folicular e não ocorrem nas superfícies (Cotran et al., 2005). Em todos os tipos de CBC, a lesão é constituída por proliferação de células basalóides que formam massas de tamanhos variados, com paliçada periférica e halo claro entre a lesão e a derme. Há dois padrões de crescimento: (1) nodular (lesão única); (2) multicêntrico, em que as células neoplásicas originam-se em múltiplos pontos na epiderme, formando várias pequenas lesões. O CBC pode apresentar variantes histológicas: adenóide, ceratótico, fibrosante e de células gigantes (Brasileiro Filho, 2016).

### **2.3.1 Formas Clínicas de CBC**

Clinicamente, os CBCs são divididos em cinco tipos: nódulo-ulcerativo, pigmentado, esclerodermiforme ou fibrosante, superficial e fibroepitelioma (Chinem e Miot, 2011), apesar de haver discordância nas classificações de alguns autores (Mantese *et al.*, 2006; Lascano e Kuznitzky, 2005).

Destes, os três principais tipos clínicos dos CBCs são: superficial, nodular e esclerodermiforme (infiltrativo), mas, mais de um tipo de carcinoma basocelular pode estar presente no tumor. Esses tumores podem sangrar, ulcerar, regredir e tornarem-se fibrosos, criando apresentações clínicas variáveis, que não se

apresentam exatamente em uma das três descrições; eles podem ser difíceis de reconhecimento. Estes tipos clínicos não têm local específico (Goldberg, 1996).

#### **2.3.1.1 Nodular**

Os CBCs nodurales começam como um nódulo pequeno, que, frequentemente, mostra alguns vasos de pequeno calibre, telangiectásicos, na sua superfície. O nódulo, em regra, aumenta lentamente de tamanho e, com frequência, sofre ulceração central. Uma lesão típica consiste, então, em uma úlcera, que aumenta lentamente, circundada por uma borda perolada, enrolada. Esta representa a assim chamada “úlceras corrosiva” (*rodent ulcer*) (Elder, 2011).

A forma nódulo-ulcerativa é mais comum, geralmente única, e acomete, sobretudo, cabeça e pescoço. Caracteriza-se como pápula ou nódulo com aspecto perolado, muitas vezes com telangiectasias de padrão característico à dermatoscopia, que posteriormente se ulcera, podendo invadir os tecidos subjacentes (Chinem e Miott, 2011).

#### **2.3.1.2 Pigmentado**

A forma pigmentada, morfológicamente, assemelha-se ao tipo anterior (nodular) - mais frequente em cabeça e pescoço -, apesar de haver variantes superficiais e esclerodermiformes (Chinem e Miot, 2011; Aoyagie Nouri, 2006). Difere daquele do tipo nodular apenas pela pigmentação marrom da lesão (Elder, 2011).

### **2.3.1.3 Esclerodermiforme**

O tipo esclerodermiforme é de pior prognóstico, apresentando grande probabilidade de recidivas e de infiltração. Acomete, principalmente a face, como uma placa deprimida de limites mal definidos, que, às vezes, frequentemente pode ulcerar. Pela monotonia dos sintomas e da apresentação clínica, o diagnóstico pode ser retardado, gerando maior morbidade cirúrgica (Chinem e Miott, 2011).

### **2.3.1.4 Superficial**

O CBC superficial consiste em uma ou em várias placas eritematosas, descamativas, apenas ligeiramente infiltradas, que aumentam lentamente de tamanho por extensão periférica. As placas são, frequentemente, circundadas, pelo menos em parte, por uma borda fina, filiforme e perolada. Essas placas, quase sempre, mostram pequenas áreas de ulceração superficial e crosta. Além disso, seu centro pode mostrar cicatrizes lisas, atróficas (Elder, 2011). Os tumores superficiais surgem, principalmente, no tronco e nos ombros, podendo ser múltiplos (Pelucchi *et al.*, 2007; Mantese *et al.*, 2006). Precisam ser diferenciados das seguintes patologias: (1) placas da doença de Bowen; (2) doença de Paget; (3) psoríase; (4) eczema; e (5) dermatofitoses (Chinem e Miot, 2011).

### **2.3.1.5 Fibroepitelioma**

O fibroepitelioma de Pinkus consiste, geralmente, em apenas um, mas de vez em quando, de vários nódulos elevados, moderadamente firmes, ligeiramente pedunculados, cobertos por pele lisa, ligeiramente avermelhada. Clinicamente, assemelha-se ao fibroma (Elder, 2011).

Essa forma de CBC é rara, localizada, preferencialmente, na região lombossacral, pubiana ou genitocrural. Inicia-se como pápula ou placa eritematosa, que pode se tornar pedunculada. Pela manifestação clínica atípica e raridade, é usual que o diagnóstico não seja suspeitado clinicamente, apenas revelado no exame histopatológico (Chinem e Miott, 2011).

## **2.4 Classificação Histopatológica**

Os carcinomas basocelulares tendem a compartilhar as características comuns de um tipo de célula basal predominante, núcleos das células lesionais periféricas em paliçada, um estroma especializado e um artefato representado por uma fenda entre o epitélio e o estroma. Além disso, existem graus variáveis de atipia citológica e atividade mitótica; algum grau destas últimas alterações está sempre virtualmente presente (Elder, 2011).

Os carcinomas basocelulares têm sido classificados como sólidos (ou indiferenciados) quando comparados aos tumores que manifestam características de diferenciação específicas como écrinas, sebáceas ou outras linhas de células. No entanto, a única comprovação histológica capaz de indicar prognóstico de

comportamento biológico e, portanto, o principal determinante do que se considera uma abordagem terapêutica adequada, é o padrão de crescimento da arquitetura do tumor (Crowson, 2006).

Esse autor considera, pois, que a arquitetura é uma questão crítica, pois pode influenciar no diagnóstico; por isso, os padrões de diferenciação apenas devem ser considerados quando reconhecidos como parte do espectro histológico do CBC (Crowson, 2006).

No carcinoma basocelular nodular, são formadas massas nodulares de células basalóides que se estendem na derme em relação com um estroma tumoral delicado e especializado. Espaços císticos podem se formar como resultado de necrose tumoral ou perda da adesão celular. Os núcleos nos carcinomas basocelulares, como regra, têm um aspecto bastante uniforme. Eles, geralmente, não mostram variação acentuada no tamanho ou na intensidade de coloração, e nem mitoses anormais, mesmo nos raros casos de carcinoma basocelular com metástase. Nos casos excepcionais de carcinoma basocelular, nos quais se encontram entremeadas, entre as células comuns do carcinoma basocelular, células com grandes núcleos hipercromáticos, núcleos múltiplos e estranhas mitoses tipo “chuva de estrelas”, a evolução clínica não é diferente daquela do carcinoma basocelular comum (Elder, 2011).

A forma esclerodermiforme é composta por numerosas ilhas tumorais que, em geral, infiltram a derme reticular e promovem intensa reação fibromatosa. A variante infiltrativa é configurada por ilhas de células basalóides pequenas e irregulares que invadem a derme, semelhantemente ao que ocorre na variante esclerodermiforme, porém com cordões de células mais finos (Chinem e Miott, 2011).

O tipo superficial caracteriza-se por brotamentos e proliferação irregular de células basalóides formando paliçada periférica fixada à superfície inferior da epiderme, geralmente atrófica. Há fibroblastos em torno das células tumorais, além de infiltrado inflamatório crônico inespecífico na derme superior. Pode apresentar aspecto multifocal, com brotamentos epiteliais descontínuos do tumor, entremeados por epiderme incólume, dificultando a avaliação das margens nas peças cirúrgicas (Chinem e Miot, 2011).

No fibroepitelioma de Pinkus, filamentos ramificados longos e finos de CBC, alguns conectados à epiderme, apresentam-se em meio a um estroma fibroso (Chinem e Miot, 2011).

O carcinoma metatípico (carcinoma basoespinocelular) é formado por focos de células com diferenciação escamosa; devido ao seu padrão de crescimento infiltrativo, tem pior prognóstico. Carcinoma misto ou combinado consiste em lesão rara formada por áreas de carcinoma basocelular lado a lado com carcinoma espinocelular (Brasileiro Filho, 2016).

Além de se apresentarem com uma pápula ou nódulo, geralmente na pele exposta ao sol, os pacientes não têm outras queixas atribuíveis ao tumor. Em raras ocasiões, uma lesão manifesta sensibilidade ou dor, que pode ser um indício de infiltração perineural nas variedades de crescimento agressivo. Comprometimento sensório-motor tem sido relatado principalmente em lesões de áreas pré-auricular e bochecha (Crowson, 2006).

## **2.5 Biologia do câncer de pele**

Os raios ultravioleta (UV) da luz solar são provavelmente o agente cancerígeno mais atuante na espécie humana. Desde muito tempo se sabe que indivíduos que trabalham ou ficam muito tempo em contato com os raios solares desenvolvem diversas lesões pré-cancerosas da pele (ceratose solar), carcinomas basocelular ou de células escamosas e melanomas. O risco de aparecimento desses tumores depende da intensidade e duração da exposição e da proteção natural de cada indivíduo. A suscetibilidade a esses tumores é inversamente proporcional à pigmentação cutânea, já que a melanina é um filtro eficiente da radiação ultravioleta (Brasileiro Filho, 2006).

A faixa ativa das radiações UV está entre 200 a 400 nm. Estudos fotoquímicos demonstram que o alvo principal dessa radiação é o DNA, no qual podem ser produzidas várias alterações, das quais a formação de dímeros de timina é a mais importante. Trata-se, pois, da produção de uma mutação puntiforme, que pode afetar oncogenes ou genes supressores de tumor (Brasileiro Filho, 2006).

Dessa forma, verifica-se que o perfil epidemiológico dos cânceres de pele não melanoma estabelece uma relação bem nítida com a exposição ao UVB como fator principal, porém, apenas nas últimas duas décadas é que se estabeleceram as bases biológicas que explicam a carcinogênese cutânea. Uma resposta característica da pele após exposição ao UV, é a presença das chamadas células de “queimadura solar” (*sunburncells*), que são queratinócitos apoptóticos resultantes de uma 'verificação celular' dependente da

proteína p53, à qual leva células potencialmente malignas, decorrentes de danos ao DNA causados pelo UV, à autodestruição (Brash *et al.*, 1996).

A exposição crônica à luz solar é responsável pela mutação da p53 na carcinogênese cutânea, desenvolvendo um papel importante no desenvolvimento dos CBCs. Assim, o p53 foi considerado um possível marcador no prognóstico da gravidade do CBC (D'Errico *et al.*, 1997; Ouhtit *et al.*, 1998).

Nesse ínterim, a compreensão da função do gene *p53*, as consequências de sua disfunção e sua relação com as QAs e carcinomas epidermóides cutâneos tornaram-se fundamentais. Acredita-se que a proteína p53 esteja relacionada com a parada na fase G1 do ciclo celular, quando é feito o reparo no DNA e a subsequente verificação da integridade genética da célula, à qual estando corrompida, desencadearia o processo de apoptose. Este processo pode ser descrito como o mecanismo intrínseco celular de defesa antitumoral em contraposição ao mecanismo extrínseco, representado pela imunidade específica e inespecífica contra o tumor. Uma vez que o mecanismo intrínseco tenha falhado na eliminação das células potencialmente malignas, apenas as defesas extrínsecas poderão atuar na prevenção da progressão tumoral (Eberle *et al.*, 2007; Leffel, 2000).

O CBC associa-se a defeitos na via de sinalização *Hedgehog*. O gene *PTCH*(protein patched homolog) é o homólogo humano do gene *patched* em drosófila, em que está envolvido com proliferação celular normal. O produto codificado pelo *PTCH* é um receptor da via *Hedgehog*, que regula a polaridade e a proliferação de certas células epiteliais. Quando não estimulado, o receptor forma um complexo com outra proteína membranosa (SMO, de *smoothened*).

Quando se liga ao seu agonista (SHH - sonic hedgehog), a SMO é liberada do complexo e ativa o fator de transcrição GLI1 (Glioma), que estimula a proliferação celular controlada – normal. Se existe mutação no *PTCH* e por mecanismo desconhecido, a SMO desliga-se do complexo e promove a ativação continuada de GLI1, que induz proliferação anormal das células (Brasileiro Filho, 2016).

Há síndromes genéticas relacionadas ao risco de desenvolvimento de CBCs, que devem ser suspeitadas quando da ocorrência de múltiplos tumores ou de sua incidência em idade jovem (Chinem e Miot, 2011).

Há muitos passos intermediários nesse processo de carcinogênese, envolvendo entre outros fatores: (1) a ativação de oncogenes; (2) desativação de genes supressores; e (3) alterações na proteção do gene *p53*. A exposição à luz solar irá induzir alterações no DNA das células epidérmicas, e seletivamente suprimir o sistema imunológico e a capacidade do corpo para procurar e destruir células alteradas com capacidade de formar tumores. À medida que envelhecemos, nossa capacidade de reparar danos ao DNA induzidos pela luz solar é reduzida, embora alguns pacientes mais jovens possam começar com uma capacidade já comprometida para reparar alterações no DNA induzidas pela luz solar (Goldberg, 1996).

## **2.6 Proliferação Celular**

A proliferação celular definida como o aumento do número de células resultante da complementação do ciclo celular, reúne uma cascata de eventos que garantem a duplicação ordenada dos componentes celulares em uma

sequência lógica e a respectiva divisão em duas células filhas (Levine et al. 1994). A partir dos anos 1970, estudos sobre os mecanismos envolvidos nesse processo evidenciaram a participação de um grande número de macromoléculas controladoras, as quais ativadas em sequências organizadas, funcionam como verdadeiros pontos de checagem – *check points* (Hartwell e Weinert, 1989). A ocorrência de falhas nesse sistema possibilita o início da progressão de neoplasias.

Dúzias de proteínas diferentes são necessárias para induzir ou restringir a proliferação celular, manter ou evitar ciclos de divisão celular, e iniciar ou inibir a apoptose (Pasternak, 2007).

. A proliferação celular é disparada por uma cascata de etapas de ativação e inativação, que, na maior parte, são mediadas por cinases de proteínas que fosforilam tirosinas, treoninas ou serinas de proteínas citoplasmáticas e nucleares. As proteínas nucleares geralmente são fatores de transcrição que regulam coletivamente a expressão de vários genes. Além das proteínas necessárias para a ativação da proliferação celular, o ciclo de divisão celular e a apoptose, outras que ajudam a afastar o câncer são usadas para reparar os danos ao DNA genômico (Pasternak, 2007).

Este ciclo envolve, pelo menos, quatro fases distintas: (1) período que antecede a síntese de DNA (G1); (2) fase de síntese de DNA (S); (3) período de pós-replicação do DNA (G2); e (4) a fase de mitose (M) que culmina com a divisão celular (Levine et al., 1994; Rabenhorst et al., 1994). Cabe ser destacada a fase G0, que envolve as células que estão fora do ciclo celular por tempo

indeterminado (Hall & Levinson, 1990; Alberts et al., 1994; Rabernhost et al., 1993 e 1994).

## **2.7 Apoptose**

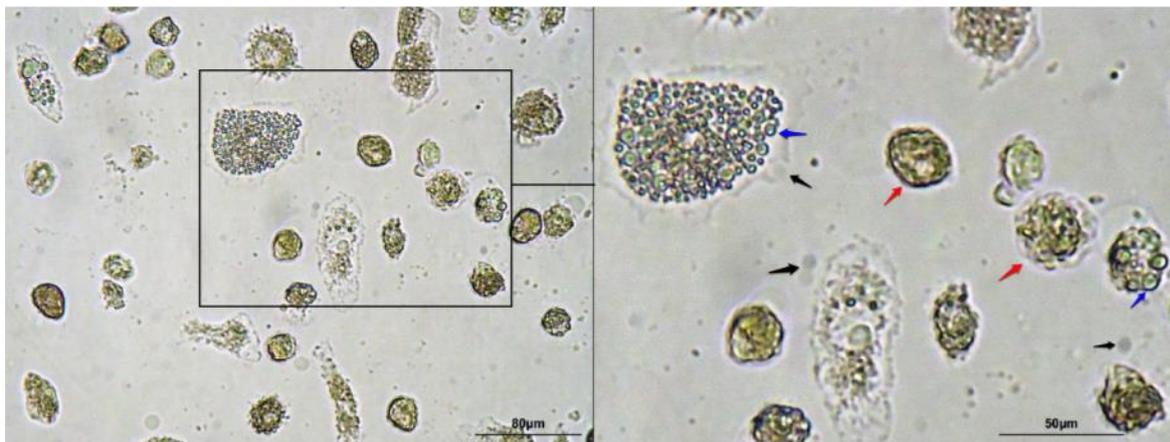
A apoptose, ou morte celular programada, é um dos processos de morte celular, juntamente com a autofagia, a necrose, e a mitose-catastrófica; os quais são classificados de acordo com suas características morfológicas e bioquímicas (Okada e Mark, 2004).

Dentre as situações em que a apoptose ocorre, destacam-se: (1) a organogênese e hematopoiese normal e patológica; (2) a reposição fisiológica de certos tecidos maduros; (3) atrofia dos órgãos; (4) resposta inflamatória; e (5) eliminação de células após dano celular por agentes genotóxicos (Ranganath e Nagashree, 2001).

Sendo essencial para a manutenção do desenvolvimento dos seres vivos, é um processo importante para eliminar do organismo células supérfluas ou defeituosas; é um fenômeno rápido e ocorre em cinco fases representadas pelas seguintes alterações: (1) retração da célula; (2) perda de aderência com a matriz extracelular e células vizinhas; (3) condensação da cromatina; (4) fragmentação internucleossômica do DNA; e (5) formação dos corpos apoptóticos (Grivicich *et al.*, 2007). A morte por apoptose apresenta outra característica marcante: a fragmentação internucleossômica do DNA, com um padrão característico - a endonuclease é ativada e produz fragmentos de DNA de tamanhos variáveis, mas sempre múltiplos de 200 pares de base (Saraste e Pulkki, 2000).

Durante a apoptose, após uma retração da célula que causa perda de aderência com a matriz extracelular e com as células vizinhas, a maioria das organelas celulares mantêm sua morfologia. No entanto, podem ocorrer: (1) ruptura na membrana externa das mitocôndrias; (2) condensação da cromatina que se concentra junto à membrana nuclear; (3) formação de prolongamentos (*blebs*) na membrana celular; (4) desintegração do núcleo em fragmentos envoltos pela membrana nuclear; (5) aumento dos prolongamentos da membrana celular (em número e no tamanho); (6) formação dos corpos apoptóticos (porções celulares envoltas pela membrana celular, resultado do rompimento dos prolongamentos da membrana celular contendo o conteúdo celular); (7) fagocitose dos corpos apoptóticos por macrófagos (remoção sem provocar processo inflamatório) (Fig. 2) (Ziegler e Groscurth, 2004; BeikzadeheDelirezh, 2014).

Nesse processo bioquímico, há o envolvimento de moléculas para o controle das vias de ativação da apoptose, destacando-se as proteínas antiapoptóticas e proapoptóticas, além de enzimas como as caspases (Grivicich *et al.*, 2007).



**Figura 2.** Monócitos periféricos no 13<sup>o</sup> dia de cultura: a morfologia das células indica a ocorrência de apoptose com características como prolongamentos (*blebbings*) (seta azul); rompimento das células (seta vermelha); e liberação dos corpos apoptóticos (seta preta) (em aumento de 40 x) (Fonte: BeikzadeheDelirezh, 2014).

### 2.7.1 Vias de apoptose

Como foi visto anteriormente, a apoptose é um programa de morte celular cuidadosamente regulado, e, portanto, com grande eficiência biológica, uma vez que requer a interação de inúmeros fatores que regulam alterações morfológicas representadas por uma sequência de eventos moleculares e bioquímicos específicos e geneticamente regulados (Saraste e Pulkki, 2000).

A apoptose, em geral, é um fenômeno biológico como a proliferação e ativação celular (Peter e Krammer, 2003). Por isso, o funcionamento correto dos sistemas de apoptose é extremamente importante para o desenvolvimento embrionário e para manter a homeostase dos tecidos, além de atuar na defesa antitumoral intrínseca e extrínseca.

Dentre os fatores que podem desencadear a apoptose (Hengartner, 2000) destacam-se os seguintes: (1) ligação de moléculas a receptores de membrana;

(2) agentes quimioterápicos; (3) radiação ionizante; (4) danos no DNA; (5) choque térmico; (6) privação de fatores de crescimento; (7) baixa quantidade de nutrientes; e (8) níveis aumentados de espécies reativas do oxigênio. A ativação da apoptose pode ser iniciada de duas diferentes maneiras: pela via extrínseca, citoplasmática ou pela via intrínseca, mitocondrial (Grivicich *et al.*, 2007).

### **2.7.1.1 Via intrínseca**

A via intrínseca de sinalização da apoptose atua, principalmente, na membrana mitocondrial. A proteína p53, sob condições normais, é rapidamente degradada no citoplasma, não havendo tempo para que ela induza as proteínas subsequentes da sua via.

Células danificadas produzem enzimas que estabilizam a proteína p53 permitindo a sua atuação e indução de outros componentes da via, como a proteína p21 que inicialmente paralisa o ciclo celular, gerando tempo para mecanismos de reparação genética atuarem. Na presença de danos irreparáveis, a ativação da p53 resulta na transativação de fatores proapoptóticos, principalmente as proteínas proapoptóticas da família Bcl2 (Hofseth *et al.*, 2004).

A inibição do ciclo celular pode ser necessária para efetiva indução da apoptose, pois ambos os mecanismos exaurem as reservas energéticas da célula, sendo assim, portanto, processos mutuamente exclusivos (Eberle *et al.*, 2007).

As proteínas Bcl2 atuam na membrana externa da mitocôndria, onde elas controlam a formação de poros, através dos quais vários fatores mitocondriais são liberados no citoplasma (Eret *al.*, 2006). Esses fatores, tais como citocromo C e endonuclease G, apresentam atividade proapoptótica quando presentes no citoplasma. A partir disso, a liberação de proteínas proapoptóticas pela mitocôndria, parece ser um passo crítico no processo de morte celular, o qual depende de um equilíbrio das proteínas da família Bcl2, pró e antiapoptóticas (Danielet *al.*, 2003).

Os fatores mitocondriais liberados no citoplasma formam complexos com outras proteínas, acabando por desencadear a cascata das caspases. As caspases são proteases que clivam certas proteínas chamadas de substratos de morte celular, ao nível do aspartato. Além de atuar na via intrínseca de apoptose, atuam em algumas vias extrínsecas como, as da granzima B e ligantes de morte (Eberle *al.*, 2007).

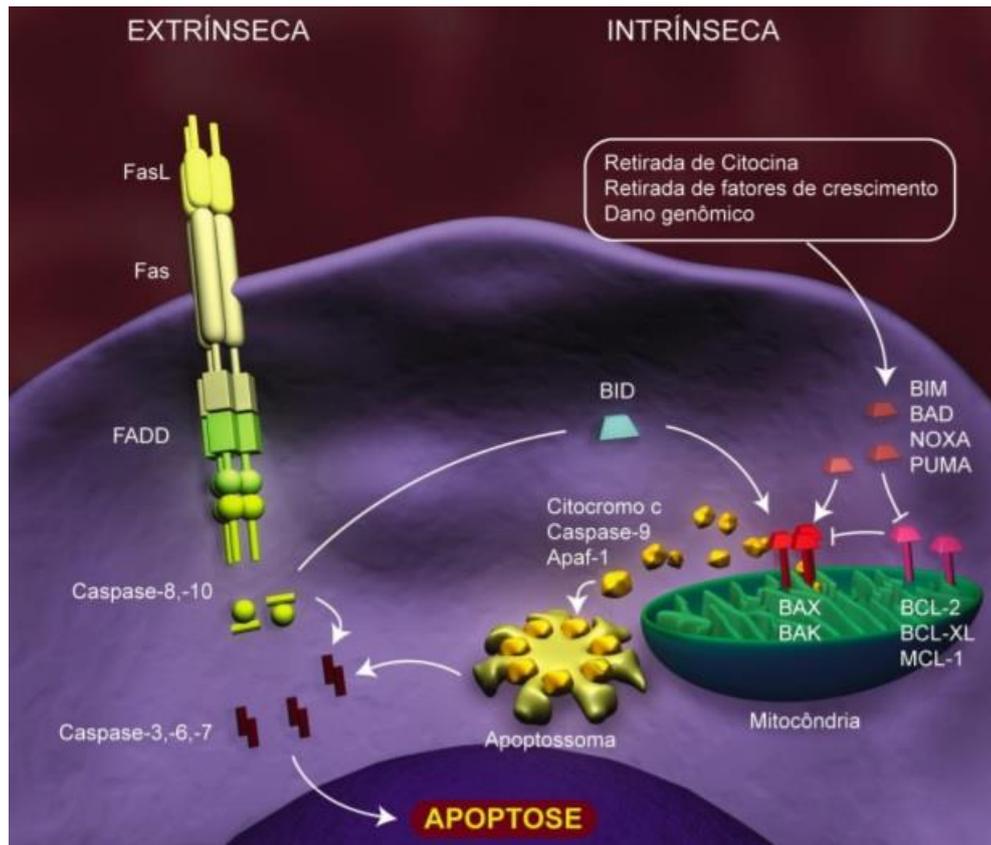
#### **2.7.1.2 Via extrínseca**

As vias extrínsecas recebem este nome por serem ativadas por sinalizadores externos, através da ligação destes a receptores de membrana ou pela penetração no citoplasma através de estruturas como as perforinas. Alguns dos sinalizadores mais bem conhecidos são, o Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF-alfa); Ligante do Fator de Necrose Tumoral (CD95L ou FasL); e Ligante do Fator de Necrose Tumoral relacionado à Indução da Apoptose (TRAIL). O acoplamento dessas proteínas aos respectivos receptores, leva à multimerização

destes com a formação de um complexo protéico conhecido como, complexo sinalizador de indução de morte (DISC), o qual ativa as caspases 8 e 10 (Petere Krammer, 2003; Engelset *al.*, 2005). A caspase 10 é crucial para a apoptose induzida por TRAIL.

Verificaram-se conexões cruzadas importantes entre essas vias de apoptose, como a transcrição de ligantes e receptores de morte pela p53, bem como, ativação de proteínas Bcl2 proapoptóticas, pela caspase 8, à qual tipicamente atua na via extrínseca (Eberle *et al.*, 2007).

A existência de uma rede de sinalização bioquímica intrincada e complexa para efetuar esta seleção, entre células destinadas à morte programada ou mantidas ativas e replicantes, pode ser observada na Figura 3.



**Figura 3.** Esquema dos sistemas intrínseco e extrínseco de apoptose.

(Fonte: Oliveira Filho, 2008).

Neste sistema existem inúmeras opções de contrarregulação necessárias para a sobrevivência das células normais, que podem ser utilizadas por células tumorais para escaparem da apoptose (Oliveira Filho, 2008).

Portanto, esta via é desencadeada pela ligação de ligantes a receptores de membrana (superfamília dos receptores de fatores de necrose tumoral - rTNF), processo que ativa as caspases (Budihardjo *et al.*, 1999) (Fig. 3). Todos os membros da família rTNF possuem um subdomínio extracelular rico em cisteína, o qual permite que eles reconheçam seus ligantes, resultando na trimerização e

consequente ativação dos receptores de morte específicos (Fig. 3), seguida pela mediação pela porção citoplasmática desses receptores (estas contêm uma sequência de 65 aminoácidos, o "domínio de morte", também conhecidos como "receptores de morte celular" (Naismith e Sprang, 1998).

Quando os receptores de morte celular reconhecem um ligante específico, os seus domínios de morte interagem com moléculas conhecidas como FADD/MORT-1. Essas moléculas têm a capacidade de recrutarem a caspase8 que irá ativar a caspase3, executando a morte por apoptose (Daniel *et al.*, 2001).

### **2.7.2 Resistência à apoptose em tumores**

As células tumorais contêm múltiplas alterações genéticas, o que lhes dá um caráter heterogêneo. Por isso, deveriam ativar as vias intrínsecas de apoptose em células normais. Adicionalmente, a maioria dos clones tumorais se caracteriza por uma expressão não usual de proteínas, às quais também deveriam atrair a atenção de células imunes. No entanto, as células tumorais podem ser resistentes à apoptose, o que explica o desenvolvimento dos tumores de pele na presença dos mecanismos de defesa do organismo, isto é, os tumores malignos apresentam a propriedade de crescerem além dos limites impostos às células normais. Ou seja, a expansão clonal de uma célula transformada depende de um descontrole da sua capacidade proliferativa e de uma crescente incapacidade de morrer por apoptose. Portanto, apesar da grande variabilidade do câncer (caráter heterogêneo), a resistência à apoptose é uma característica que se destaca

maioria dos tumores malignos, o que tem sido demonstrado nos inúmeros estudos desenvolvidos nos últimos anos (Okada e Mark, 2004).

A tumorigênese mostra que essa resistência à morte programada pode ocorrer por vários mecanismos e em vários momentos, destacando-se entre eles a resistência em células que escaparam do controle do crescimento e da diferenciação normais. Esse controle que pode ser de seis formas, por: (1) fatores solúveis; (2) contatos célula-célula; (3) contatos célula-matriz extracelular; (4) lesões no DNA; (5) hipóxia; (6) espécies reativas do oxigênio (Castedo *et al.*, 2004).

As principais causas de resistência à apoptose são defeitos nas vias de sinalização proapoptóticas. Conseqüentemente, o bloqueio da via intrínseca está presente na maioria dos tumores, sendo que o gene *p53* é o supressor tumoral mais frequentemente mutado, desativado em aproximadamente metade de todos os tumores, particularmente nos cânceres epiteliais, chegando a comprometer 90% dos carcinomas epidermóides de pele (Leffell, 2000).

Da mesma forma, verifica-se bloqueio da sinalização extrínseca em vários tumores, como a perda de receptores de superfície proapoptóticos TRAIL, em certas linhagens de melanomas, e a redução de ligantes CD95 em queratose actínicas e na pele exposta ao UV (Kurbanov *et al.*, 2005; Bachmann *et al.*, 2001).

Por fim, as vias comuns efetoras da apoptose, executadas pelas caspases, também podem ser inibidas, como observou-se em melanomas e carcinomas epidermóides, com a elevação das proteínas inibidoras de apoptose (IAPs). Um

exemplo dessa família de proteínas é a survivina, que já foi identificada anormalmente ativa em diversos tumores, estando ausente em células plenamente diferenciadas (Grivicich *et al.*, 2007).

As IAPs apresentam em comum pelo menos uma subunidade de aproximadamente 70 aminoácidos da repetição inibidora da apoptose do baculovírus (BIR). Essa característica, fornece a tais moléculas, a capacidade de aderir e bloquear as caspases 3 e 7, efetoras da apoptose (Sahet *et al.*, 2006).

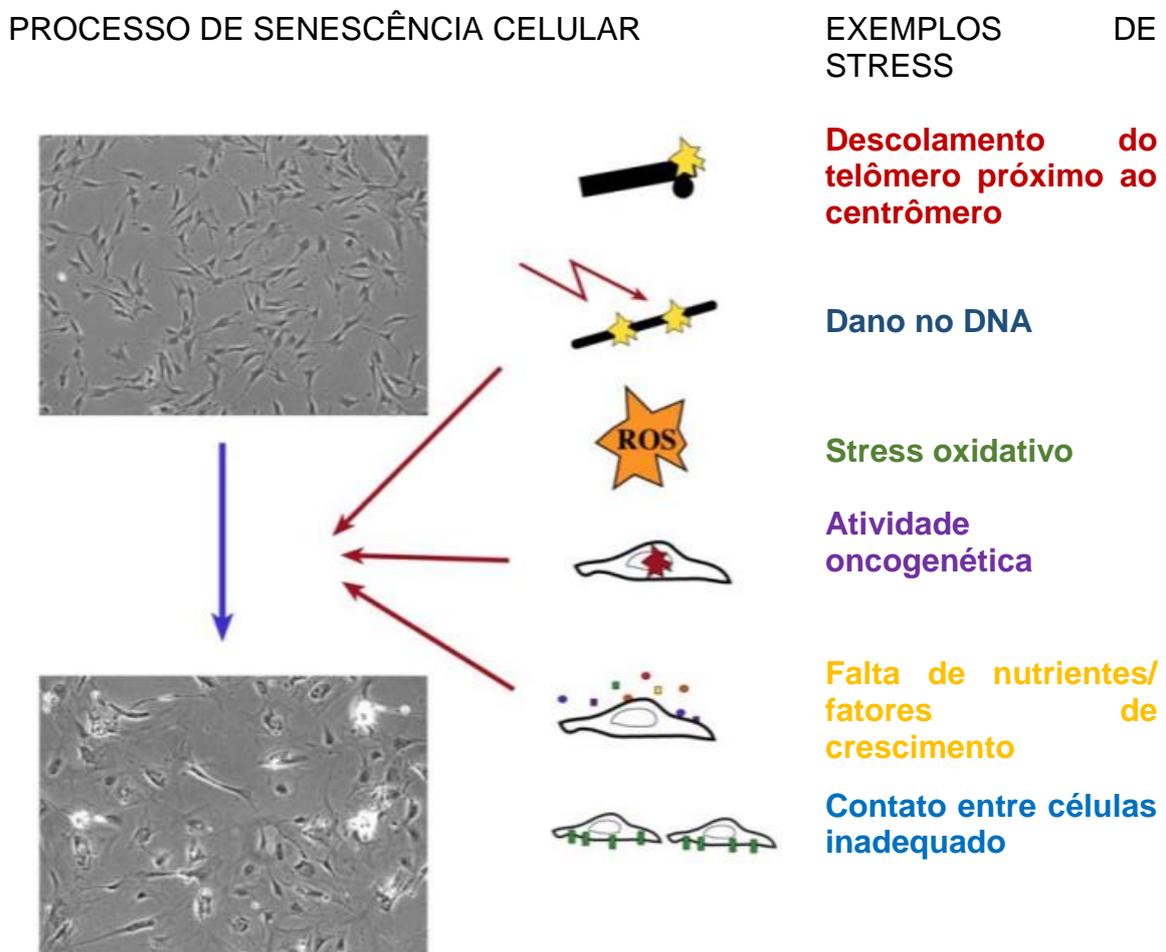
Recentemente, outro alvo na terapia anticâncer tem sido os receptores proliferadores ativados de peroxissomas (PPARs), que são receptores nucleares que atuam como fatores de transcrição. Entre outras funções, eles atuam na diferenciação celular, desenvolvimento e metabolismo.

Os ativadores extrínsecos do PPAR mais conhecidos são as glitazonas, utilizadas no tratamento do diabetes tipo II, por reduzirem a resistência à insulina, no entanto, verificou-se atividade proapoptótica dessas medicações, assim como de outros ativadores do PPAR, em células neoplásicas, principalmente através da redução dos níveis de Bcl2 e ativação das caspases 3 e 7 (Belfiore *et al.*, 2009).

Adicionalmente, o fator nuclear kappaB (NF- $\kappa$ B), que será discutido adiante, o qual, ao lado das suas importantes atividades proinflamatórias, controla a expressão de algumas proteínas antiapoptóticas das famílias Bcl2 e IAP, pode estar hiperativo, como já foi descrito em diversos tumores (Eberlen *et al.*, 2007).

## 2.8 Senescência

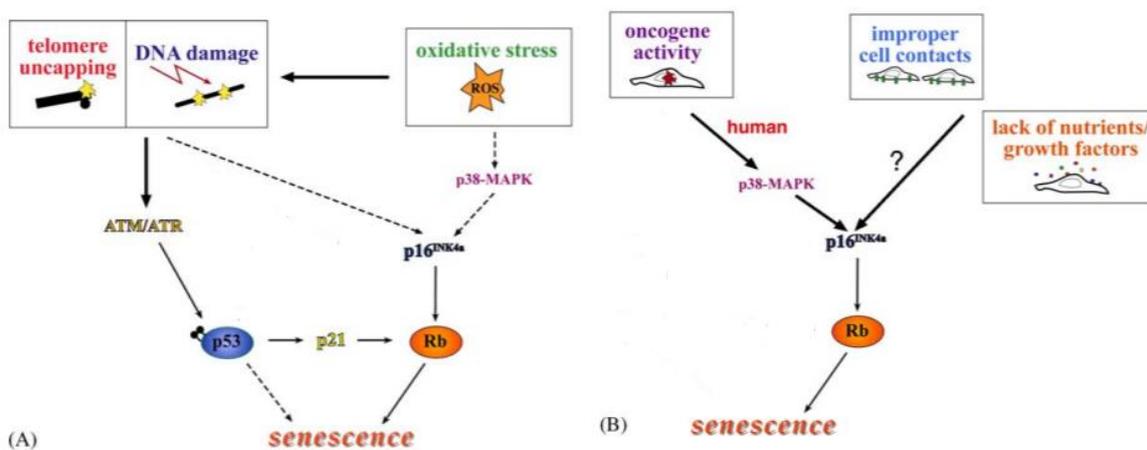
A senescência celular pode ser considerada um programa que é ativado por células normais em resposta a vários tipos de stress. Segundo Serrano e Blasco (2001) e Lloyd (2002), pelo menos quatro se destacam entre outros: (1) descolamento da cromátide no ponto do telômero; (2) dano no DNA; (3) estresse oxidativo; (4) atividade oncogênica, entre outros (Fig. 5).



**Figura 4** - Sinais que ativam a senescência: múltiplos tipos de stress podem induzir as células a entrarem na senescência; a combinação de diferentes níveis de stress determina a rapidez com que a célula entrará na senescência. (Adaptado de Ben-Porath e Weinberg 2005).

Em seu trabalho de revisão, Ben-Porath e Weinberg (2005) apresentam os mais recentes avanços referentes ao esclarecimento dos estímulos que elicitam a senescência, com destaque para os caminhos moleculares ativados por esses estímulos, e ainda a forma como esses sinais determinam que uma população de células entre em senescência (Fig. 6).

A senescência pode ocorrer seguindo um período de proliferação celular ou de uma maneira mais rápida em resposta a fatores que desencadeiam estresses agudos. Uma vez iniciada o processo de senescência, as células param de se dividir e passam por uma série de alterações dramáticas na morfologia e nos processos metabólicos (Ben-Porath e Weinberg, 2004).



**Figura 5**– Ativação do programa de senescência por diferentes estímulos em células humanas: (A) Na presença da p53: 1. Descolamento da cromátide no ponto do telômero induzindo senescência principalmente através do caminho do “dano ao DNA”, ativando a ATM/ATR, para estabilizar a p53; 2. O stress oxidativo pode ativar a p16 em certas condições e pode ser mediado pela p38-MAPK. (B) Na ausência da p53: 1 Ativação da oncogênese RAS induz senescência pela p16INK4a; 2. A p38-MAPK desempenha um papel na mediação da senescência induzida pela RAS; 3. A p16INK4a é ativada pelo estresse fisiológico adicional para induzir a senescência. (Adaptado de Ben-Porath e Weinberg 2005).

Trabalhos têm sinalizado que a senescência celular parece desempenhar um importante papel na supressão tumoral e pode contribuir para o envelhecimento do organismo, no entanto, ainda não existem descrições detalhadas para situações *in vivo* (Rocco e Sidransky, 2001; Schmitt et al., 2002; Liu et al., 2004)

Estudos recentes têm fornecido importantes elementos referentes ao modo como as diferentes formas de estresse e os estímulos ativam os caminhos que levam à senescência. Esses estudos têm revelado que uma população de células em crescimento pode ser influenciada por uma combinação de diferentes estresses fisiológicos que agem simultaneamente. Os caminhos sinalizadores ativados por esses estresses são canalizados para as proteínas p53 e Rb. A combinação dos níveis de atividade dessas proteínas determina as células que entrarão em senescência (Narita et al., 2003).

Também merece ser destacado que muitas células humanas possuem um limite interno para o número de vezes que podem se dividir quando estimuladas a proliferar em cultura: elas permanentemente param de se dividir após um certo número de ciclos (p. ex., 25 a 50 para fibroblastos humanos), um fenômeno conhecido por **senescência replicativa**. Este mecanismo de contagem de ciclos de divisão geralmente depende do encurtamento progressivo dos telômeros situados no fim dos cromossomos, o que eventualmente muda suas estruturas. A replicação do DNA telomérico durante a fase S depende da enzima **telomerase**, que mantém a estrutura da sequência telomérica e promove a formação de proteínas com estrutura de quepe que protegem as extremidades dos cromossomos. Como muitas células humanas proliferativas (exceto células-

tronco) são deficientes em telomerase, seus telômeros encurtam a cada divisão celular, e o quepe protetor se deteriora. Eventualmente, as extremidades alteradas dos cromossomos engatilham a parada permanente do ciclo celular (Alberts et al., 2010).

Segundo esses autores, células humanas cancerosas evitam a senescência celular replicativa de duas maneiras. Primeiro, elas adquirem alterações genéticas e epigenéticas que desarmam o controle de pontos de verificação, o que permite que as células continuem no ciclo mesmo quando os telômeros perdem a proteção protéica do quepe. Mutações que inativam a via da p53 possuem este efeito, sendo muito comuns em células cancerosas. Outra estratégia para escapar à senescência replicativa é que as células cancerosas frequentemente mantêm atividade telomérica durante a proliferação, evitando que seus telômeros encurtem ou fiquem desprotegidos do quepe (Alberts et al., 2010).

## **2.9 Marcadores biológicos**

Dentre os marcadores biológicos, foram utilizados neste trabalho os seguintes: (1) Ki-67; (2) p53; (3) survivina; e (4) NF- $\kappa$ B ou p105. Considerando as diferenças de expressão, a seguir serão apresentadas algumas características de cada um deles.

### 2.9.1 Ki-67

Ki-67 é uma proteína não-histônica, de meia-vida curta - aproximadamente 90 minutos (Heidebrecht et al. 1996)-, presente em todas as fases do ciclo celular, exceto na G0, e em todos os tipos celulares com capacidade proliferativa (Scholze e Gerdes 2000).

Em relação à intensidade da presença do Ki-67 nas diferentes fases do ciclo celular, mais especificamente nas fases S e G2, ela aumenta com máxima intensidade na metáfase começando a diminuir na telófase (Du Manoir et al. 1991, Bruno e Darzynkiewicz 1992, Starborg et al. 1996).

A depender da fase do ciclo celular, o Ki-67 poderá ser localizado no núcleo (G1), no nucléolo (S e G2), na superfície dos cromossomos (metáfase) ou difuso no citoplasma após a rotura da membrana nuclear (Du Manoir et al., 1991; Starborg et al., 1996; Kill, 1996), sendo também descrito no citoplasma durante a fase S (Braun et al. 1988; Van Dierendonck et al., 1989).

Observa-se que este marcador vem sendo estudado há mais de 30 anos (Braun et al. 1988), e estudos recentes têm sido desenvolvidos no sentido de identificar métodos imuno-histoquímicos para determinar seu valor prognóstico (Plavetić et al. 2015).

### 2.9.2 p53

A p53, proteína não histona, de controle do ciclo celular permanece após a remoção de histonas regulada por acetilação e desacetilação. Os níveis de acetilação aumentam significativamente em resposta ao estresse. Enquanto na ausência do estresse celular, a p53 é mantida em baixos níveis, sem exercer efeito sobre o destino da célula (Luo et al., 2000; Oren, 2003).

A proteína p53 (*phosphoprotein 53*) é codificada pelo gene supressor de tumor *TP53*, gene regulador de uma extensa rede responsável pelo controle da integridade do genoma diante dos danos celulares (alterações cromossômicas, depleção de metabólitos, choque térmico, hipóxia, oncoproteínas virais, ativação de oncogenes celulares, entre outros) (Menendez e Lupu 2007; Maximov e Maximov 2008; Ferreira e Rocha 2010). Assim, pode-se considerar que fatores como o estresse, assim como, cofatores de transcrição, também podem influenciar a interação direta entre a p53 e o reparo ao DNA (Vogelstein et al., 2000).

Essas reações são observadas durante o desenvolvimento de carcinomas e provocam mudanças biológicas, como o equilíbrio entre a apoptose e a sobrevivência celular (Menendez e Lupu 2007; Petitjean et al., 2007), assim como a proliferação celular. As células tumorais, por outro lado, são consideradas geneticamente instáveis e, conseqüentemente, acumulam rearranjos cromossômicos desequilibrados (Pampalona et al., 2012).

A excessiva proliferação celular leva ao encurtamento dos telômeros (estruturas que formam a extremidade dos cromossomos) os quais, quando excessivamente curtos, promovem a instabilidade cromossômica, fenômeno

identificado no início da formação do carcinoma humano. Na proliferação celular excessiva, ocorre deficiência no ponto de checagem por disfunção da p53, promove o aparecimento de telômeros não nivelados, causando tipos complexos de anormalidade genômicas características das células tumorais (Artandi et al. 2000). Outra disfunção provocada pela p53 é a tetraploidia e que também é observada nos primeiros estágios da carcinogênese. (Pampalona et al., 2012).

### **2.9.3 NF-kB (p105)**

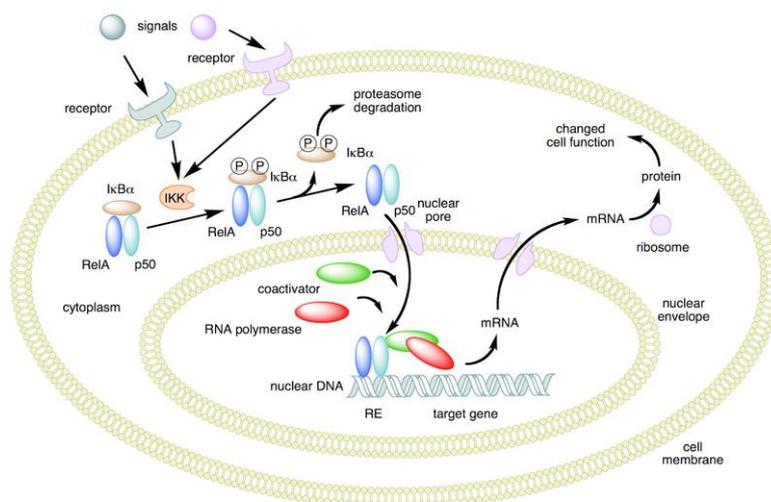
O NF-kB (ou p105), descoberto em 1986 (Sen e Baltimore, 1986), representa uma família de proteínas que atuam como fatores de transcrição relacionados a várias atividades celulares, principalmente respostas imune e inflamatória, crescimento celular e apoptose (Gilmore, 1999).

O NF-kB apresenta-se no citoplasma como homodímeros ou heterodímeros com proteínas do grupo Rel. Quando as primeiras se apresentam lisadas ou sofrem parada de transcrição, tornam-se ativas e migram para o núcleo onde se ligam a sequências específicas de 9 ou 10 bases chamadas sítios kB. Normalmente, no final dos trechos de DNA transcritos, há a sequência para a produção da proteína inibidora I $\kappa$ B, voltando a bloquear o NF-kB que é translocado para o citoplasma para ser reutilizado (Gilmore, 1999).

Alguns autores demonstraram que o NF-kB desempenha um papel essencial no câncer, regulando a expressão dos genes envolvidos no crescimento celular e proliferação, apoptose, angiogênese e metástase (Karin e Lin, 2002;

Zhanget *al.*, 2009). Assim como, durante processos inflamatórios, há uma sinalização entre NF- $\kappa$ B e seus reguladores. Esse mecanismo tem sido objeto de muitos estudos, porém seus mecanismos moleculares não foram totalmente especificados(Perkins, 2012; Bacher e Schmistz, 2004).

A atividade do NF- $\kappa$ B é primariamente regulada pela interação com proteínas inibidoras I $\kappa$ B, às quais impedem o influxo do NF- $\kappa$ B para o núcleo e bloqueiam os seus sítios de ligação com o DNA (Fig. 7).



**Figura 6.** Via de ativação do NF- $\kappa$ B (Fonte: Gilmore, 1999).

Essa regulação ocorre pela degradação das I $\kappa$ Bs ligadas ao NF- $\kappa$ B, através das quinases I $\kappa$ B serina-específicas (IKKs). Já as IKKs podem ser ativadas por inúmeros sinais intra e extracelulares, formando uma espécie de tronco de ativação do NF- $\kappa$ B, conforme especificado na Figura 7(Gilmore, 1999).

### 2.9.4 Survivina

A survivina, proteína inibidora da apoptose, regula a divisão celular com sua atividade na fase G2/M do ciclo celular. Sabe-se que sua expressão está relacionada ao maior potencial de transformação maligna e de prognóstico ruim, em duas situações principais: em carcinomas de células escamosas (CCE), mais indiferenciados; e nos casos onde há comprometimento de linfonodos (Lo Muzio *et al.*, 2001). Localizada nos microtúbulos dos fusos mitóticos, região requerida para a inibição da apoptose, e reconhecida como membro da família gênica inibidora da apoptose (IAP) (Sanino e Shousha, 1994).

A survivina está presente durante o desenvolvimento normal dos tecidos fetais, mas indetectável nos diferentes tecidos humanos, com exceção do timo, testículo, placenta, progenitores hemopoiéticos e de células endoteliais (Grossman, 2004). Está expressa de maneira aberrante em muitos cânceres epiteliais de origem hematopoiética (Sanchez *et al.*, 1998; Xie *et al.*, 2006). Nas neoplasias epiteliais, a imunexpressão da survivina torna-a alvo de diferentes estudos, como no adenocarcinoma de estômago, intestino grosso, pulmão e próstata (Sanino e Shousha, 1994; Ichikawa *et al.*, 1992), impondo um prognóstico mais agressivo quando sua expressão é citoplasmática.

Estudos *in vitro* e *in vivo*, têm demonstrado que a inibição da expressão da survivina induz à apoptose, reduzindo o crescimento do tumor e sensibilizando o tumor à quimioterapia (Zaffaroni e Daidone, 2002). Trata-se de um fator celular envolvido na quimiorresistência e radiorresistência em tumores humanos, sugerindo que a inibição dessa proteína pode levar à uma sensibilização aos tratamentos contra o câncer (Zaffaroni *et al.*, 2005).

### ***3. Objetivos***

### **3. Objetivos**

#### ***Objetivo Geral***

Avaliar a expressão de marcadores de proliferação celular e apoptose em carcinomas basocelulares dos tipos nodular, superficial, esclerodermiforme e tumores recidivados.

#### ***Objetivos Específicos***

1. Comparar a expressão diferencial dos marcadores p53, Ki-67, Survinina e p105 (NF-kB) em subgrupos de carcinomas basocelulares e tumores recidivados.
2. Avaliar os padrões de correlação entre as expressões dos marcadores p53, Ki-67, Survinina e p105 (NF-kB) em subgrupos de carcinomas basocelulares e tumores recidivados.

## ***4. Material e Métodos***

#### 4. Materiais e Métodos

Foi conduzido um estudo transversal envolvendo amostras de carcinomas basocelulares medindo menos de 2cm de diâmetro (estadiamento I), predominantemente, de 50 pacientes, topograficamente separadas em epiderme adjacente e tumorais, totalizando 1.200 campos histológicos submetidos ao protocolo de imunomarcação para Ki-67, p53, survivina e p105, levando em consideração os subtipos nodulares - ou sólidos – (n=18), superficiais (n=6), esclerodermiformes (n=6) e neoplasias que resultaram em recidiva (n=20).

Os tumores foram selecionados entre os registrados no serviço de patologia da Faculdade de Medicina da Unesp de Botucatu, nos anos de 2012 a 2013, a partir dos relatórios de exames histopatológicos. Foram selecionados tumores com subtipos histológicos únicos para a amostra de CBC nodulares, superficiais e esclerodermiformes, como forma de tentar compreender o comportamento dos subtipos de CBC individualmente.

As amostras de pele removidas durante procedimento cirúrgico foram fixadas em formol a 10% e, posteriormente, submetidas ao processamento histológico de rotina. Foram selecionados 5 blocos de parafina dos tumores de cada subtipo histológico e das neoplasias que resultaram em recidiva, totalizando 20 blocos de carcinomas basocelulares. Os blocos foram seccionados sendo obtidos 4 cortes de cada bloco para aplicação dos anticorpos primários, totalizando 80 cortes, nos quais foram realizadas 6 micrografias, sendo 3 na área dos blocos tumorais e 3 dos epitélios normais (Figura 7).

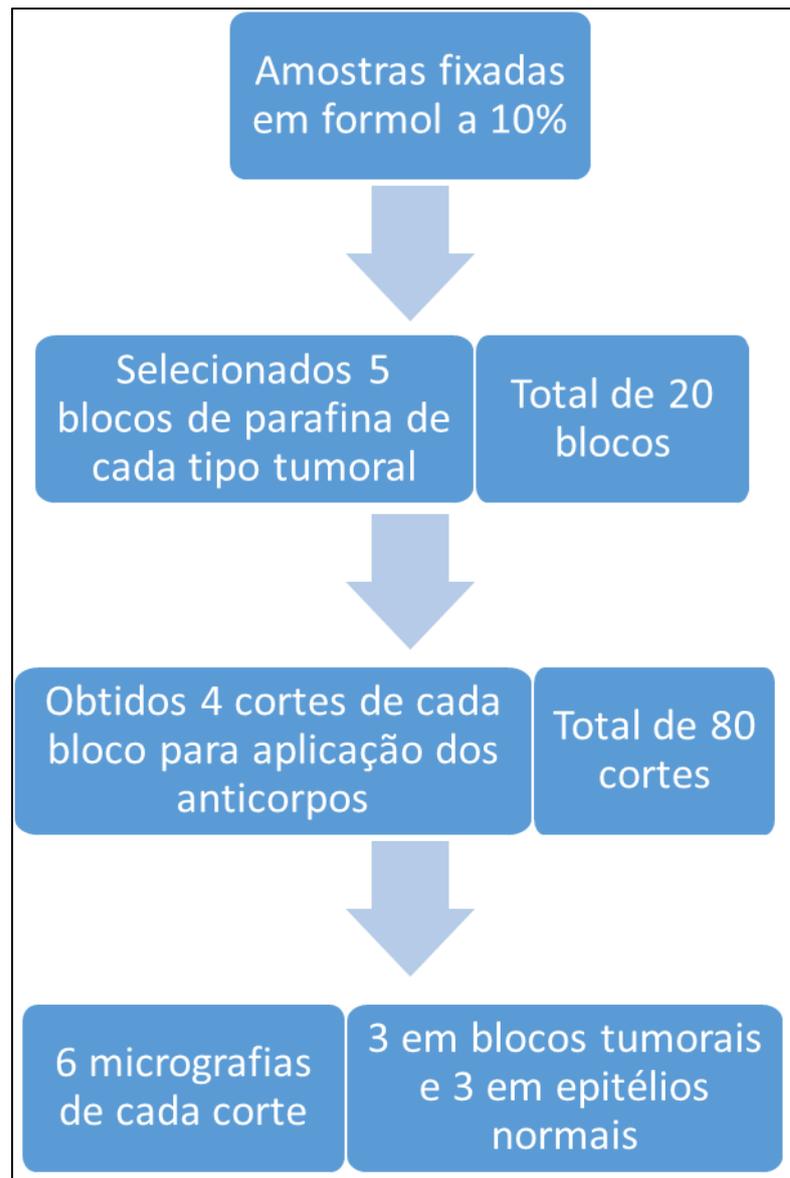


Figura 7: Procedimentos histológicos.

As lâminas histológicas desses espécimes foram submetidas ao protocolo de marcação imuno-histoquímica para os marcadores Ki-67, p53, survivina e NF-kB. As reações de cada anticorpo foram realizadas no mesmo momento, sob mesmo protocolo. Controles positivos e negativos das marcações foram realizados para cada anticorpo.

#### 4.1 Técnica de Imuno-histoquímica

A técnica de imuno-histoquímica requer quatro passos: (1) preparação das amostras; (2) recuperação antigênica; e (3) desparafinização; e (4) reação de Imuno-histoquímica automatizada (ver Apêndice 1 para detalhamento).

No primeiro passo, os blocos foram seccionados para obtenção dos cortes, que foram estendidos em lâminas histológicas. Os quatro anticorpos primários (marcadores) utilizados nesse estudo foram Ki-67 (clone MIB1), p53 (clone DO-7), survivina e NF-kB (p105).

No segundo passo, foi utilizado o equipamento PT-LINK (Dako) com as soluções de pH alto (Dako) para p53 e p105, e de pH baixo (Dako) para Ki-67 e survivina por 20 minutos, após atingir a temperatura de 95°C. Em seguida, no terceiro passo, os cortes dos tecidos foram desparafinizados durante a recuperação antigênica no equipamento PT-LINK (Dako).

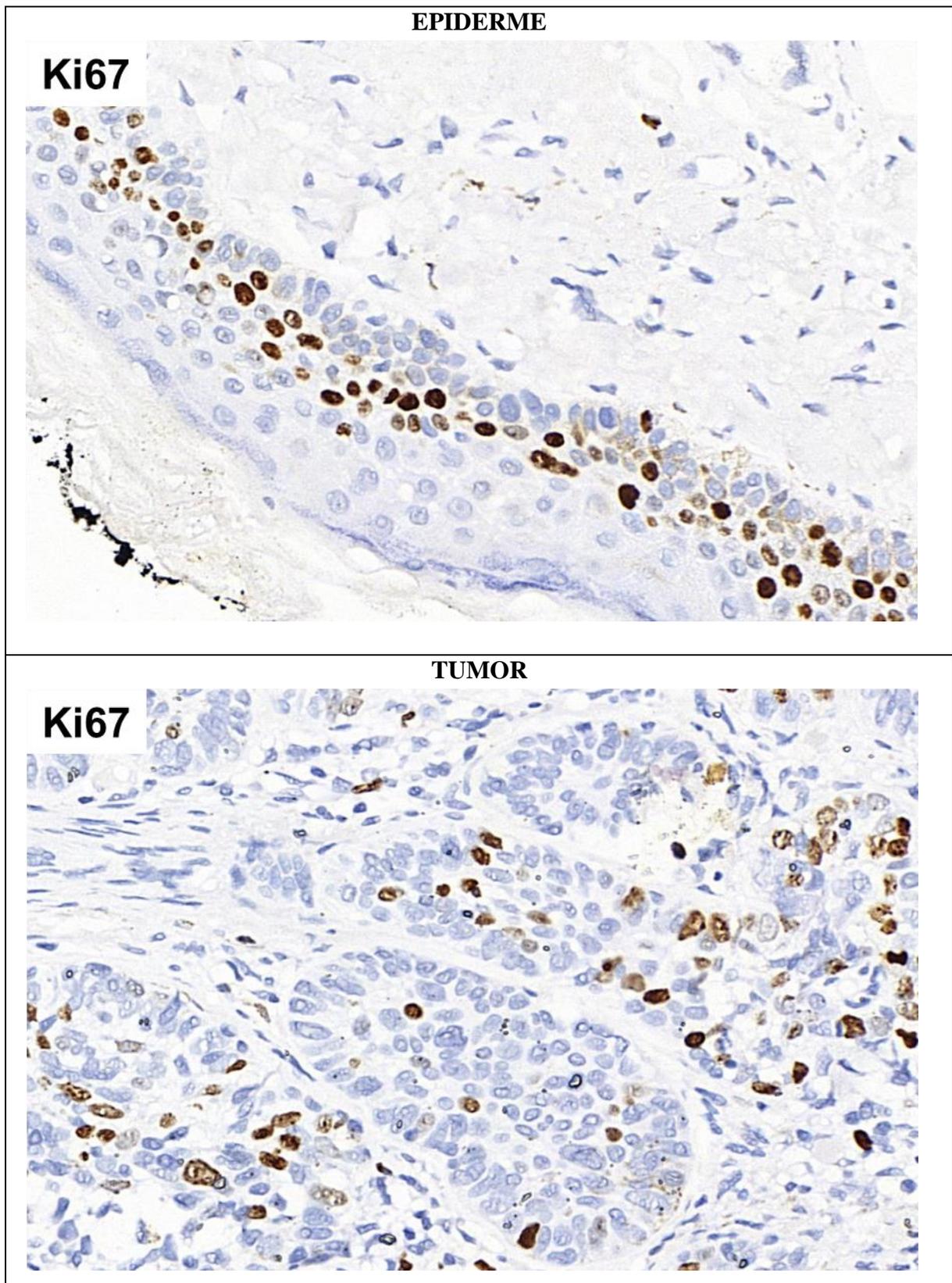
Finalmente, o quarto passo foi realizado com a reação de imuno-histoquímica automatizada utilizando o equipamento Dako Link 48, que ocorreu em treze etapas descritas em detalhe no Apêndice 1.

Os dados foram obtidos a partir de imagens capturadas em triplicata das áreas de maior marcação imuno-histoquímica (*hotspots*), através de visualização em microscópio óptico (Fig. 8).

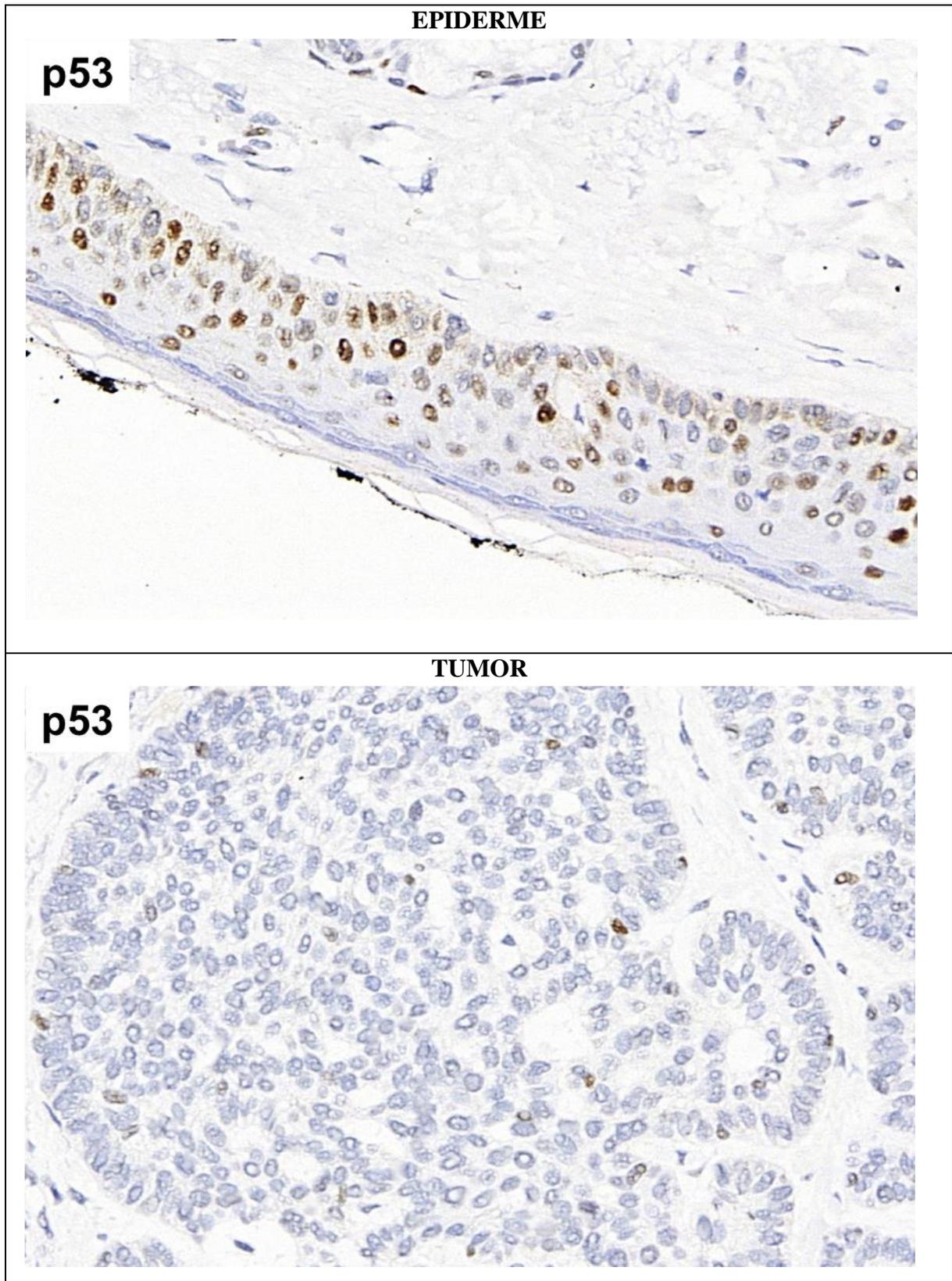
Em relação à obtenção dos dados referentes aos marcadores nucleares Ki-67 e p53, calculou-se o percentual de marcação nuclear nos campos histológicos estudados a partir da contagem das células marcadas, que foram comparadas ao total de células do campo.

No caso da survivina, foi feita uma contagem mais específica, para a determinação do percentual de células com marcação nuclear e com marcação citoplasmática em cada campo estudado, utilizando-se a mesma técnica para a obtenção dos dados.

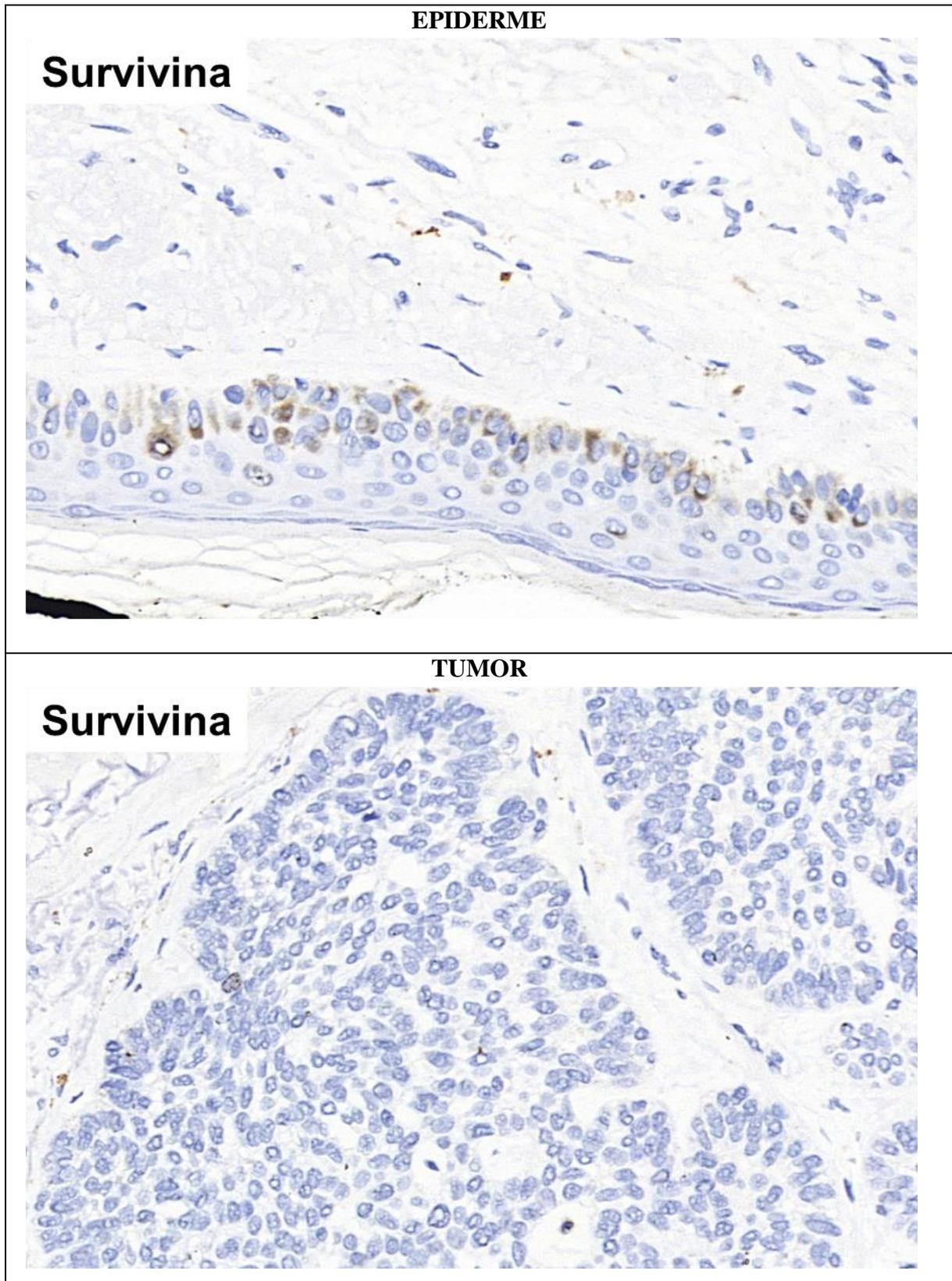
Diferentemente dos três marcadores anteriormente indicados, os dados para o marcador p105 foram obtidos a partir da mediana do histograma de cor das áreas marcadas (variando de 0 a 256). O coeficiente de marcação dos campos foi calculado a partir da análise de imagem digital que segmenta os pixels referentes à marcação “marrom” da imuno-histoquímica em imagens padronizadas do tecido-alvo. Foi empregado o algoritmo de deconvolução de cor para separação das estruturas, e utilizado o software ImageJ para análise das imagens.



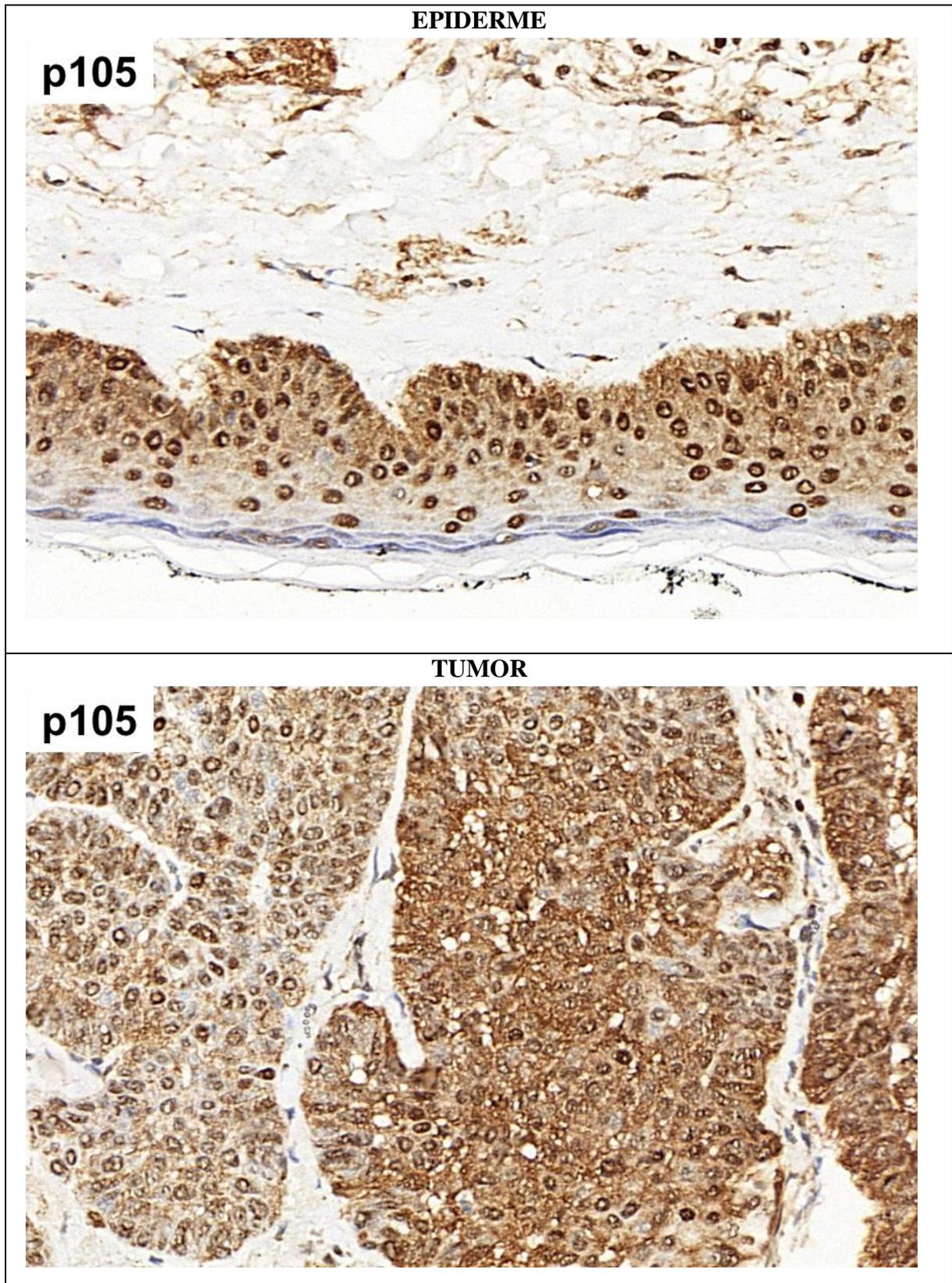
**Figura 8a** Fotomicrografias das imunomarcações do carcinoma basocelular [amostra B819-13]. Na primeira coluna, imagens do epitélio; na segunda coluna, imagens do tumor. Captura realizada com objetiva de 40X.



**Figura 8b** Fotomicrografias das imunomarcações do carcinoma basocelular [amostra B819-13]. Na primeira coluna, imagens do epitélio; na segunda coluna, imagens do tumor. Captura realizada com objetiva de 40X.



**Figura 8c** Fotomicrografias das imunomarcações do carcinoma basocelular [amostra B819-13]. Na primeira coluna, imagens do epitélio; na segunda coluna, imagens do tumor. Captura realizada com objetiva de 40X.



**Figura 8b** Fotomicrografias das imunomarcações do carcinoma basocelular [amostra B819-13]. Na primeira coluna, imagens do epitélio; na segunda coluna, imagens do tumor. Captura realizada com objetiva de 40X.

## **4.2 Análise estatística dos dados**

Para a realização das análises estatísticas, os dados de cada triplicata (as três micrografias de cada tipo de célula, tumorais e de epiderme normal) foram resumidas pela média aritmética. Desta forma, um total de 1.200 micrografias deram origem a valores para 100 médias, de 50 pacientes. Estes dados foram avaliados, então, considerando cada média de triplicada como uma unidade amostral, permitindo a comparação de epiderme com os tumores de cada tipo, e uma vez para cada tipo de marcador.

Previamente à análise, os dados foram submetidos a testes de normalidade de Shapiro-Wilk, e a partir dos resultados foi tomada a decisão de apresentá-los utilizando média e desvio padrão (para dados normais) ou mediana e quartis (para dados não normais). Quando houve rejeição da normalidade, os dados foram então comparados com outras distribuições de probabilidades (gamma, lognormal, etc) a partir do diagrama Q-Q, de forma a determinar a melhor distribuição a ser utilizada nas análises.

As análises do efeito da expressão imuno-histoquímica de cada marcador em cada tecido, foram realizadas a partir do uso de modelos lineares generalizados (GLMs), com correção *post-hoc* de Sidak sequencial. Além da avaliação individual de cada marcador, foi analisada pelos mesmos métodos a razão entre as expressões do marcador Ki-67 em relação aos marcadores p53 e Survivina Nuclear.

Finalmente, a correlação entre os resultados de cada marcador foi avaliada a partir de coeficientes de correlação de Pearson ou Spearman (novamente escolhidos de acordo com normalidade ou não dos dados envolvidos), com correlações lineares estimadas e comparadas entre os grupos.

Os grupos analisados e os marcadores de proliferação e apoptose foram explorados conjuntamente por Análise de Correspondência Múltipla.

Os dados foram tabulados em MS Excel, e analisados pelo *software* IBM SPSS 20, considerando um nível de significância bicaudal de 0,05 (significante se  $p \leq 0,05$ ) para todos os testes.

## ***5. Resultados***

## 5. Resultados

A amostra foi composta de cortes histológicos de 50 indivíduos, sendo 25 (50%) do sexo feminino e 25 (50%) do sexo masculino. A idade dos pacientes apresentou média de  $64,4 \pm 14,2$  anos, e o diâmetro das lesões,  $0,73 \pm 0,47$  cm. As informações por paciente estão individualizadas na Tabela 1.

Tabela 1 – Dados referentes às características dos indivíduos da amostra para avaliação dos marcadores tumorais (Ki-67, p53, survivina e p105): gênero, idade (em anos), raça, estado civil, profissão e características da lesão (topografia, diâmetro em centímetros, tipo histológico e quantidade).

Paciente	Gênero	Idade (anos)	Raça	Estado civil	Profissão	LESÃO			
						Topografia	Diâmetro (cm)	Tipo Histológico	Quant.
B0689	F	63	branca	solteira	professora	Pálpebra inferior E	0,4	Nodular	1
B0762	M	66	branca	não informado	não informado	Cervical lateral E	1,5	Nodular	1
B0764	F	84	branca	viúva	não informado	Ponta do nariz	0,7	Nodular (Recidiva)	1
B0819	M	85	branca	não informado	não informado	Dorso do nariz	0,4	Nodular	1
B0820	F	51	branca	casada	cozinheira	Retroauricular E	1,2	Nodular	1
B0865	M	84	branca	casado	empregado rural	Parotídea D	0,5	Nodular (Recidiva)	1
B0870	F	76	branca	casada	aposentada	Pré-auricular D	0,5	Nodular (Recidiva)	1
B0897	F	71	branca	casada	do lar	Sulco nasal D	0,5	Nodular (Recidiva)	1
B1044	M	61	branca	casado	torneiro mecânico	Dorso	0,8	Nodular	1
B1045	F	79	branca	viúva	aposentada	Malar E	0,8	Nodular (Recidiva)	1
B1048	M	68	branca	solteiro	motorista	Malar E	1,5	Nodular	1
B1053	M	58	branca	casado	aposentado	Frontal	0,6	Nodular	1

Continua ...

Tabela 1 – Dados referentes às características dos indivíduos da amostra para avaliação dos marcadores tumorais (Ki-67, p53, survivina e p105): gênero, idade (em anos), e características da lesão (topografia, diâmetro em centímetros, tipo histológico e quantidade). (continuação)

Paciente	Gênero	Idade (anos)	Raça	Estado civil	Profissão	LESÃO			
						Topografia	Diâmetro (cm)	Tipo Histológico	Quant.
B1070	M	85	branca	casado	aposentado	Ombro D	0,8	Nodular (Recidiva)	1
B1073	M	44	branca	casado	pedreiro	Pré-auricular E	0,7	Nodular	1
B1128	M	63	não informado	não informado	não informado	Dorso do nariz	0,6	Nodular	1
B1138	M	62	branca	casado	professor	Dorso do nariz	0,4	Nodular	1
B1270	M	76	branca	casado	aposentado	Dorso do nariz	0,5	Nodular (Recidiva)	1
B1276	F	52	branca	casada	do lar	Asa D do nariz	0,4	Nodular (Recidiva)	1
B1349	F	61	branca	casada	do lar	Cervical posterior	0,4	Nodular (Recidiva)	1
B1430	M	77	branca	casado	comerciante	Orelha D (hélice)	1,5	Nodular	1
B1431	M	68	branca	casado	aposentado	Temporal E	1,0	Nodular	1
B1434	F	52	branca	casada	do lar	Temporal E	0,9	Nodular (Recidiva)	1
B1496	F	46	branca	solteira	do lar	Zigomática E	0,8	Nodular	2
						Retroauricular E	0,8		

Continua...

Tabela 1 – Dados referentes às características dos indivíduos da amostra para avaliação dos marcadores tumorais (Ki-67, p53, survivina e p105): gênero, idade (em anos), e características da lesão (topografia, diâmetro em centímetros, tipo histológico e quantidade). (continuação)

Paciente	Gênero	Idade (anos)	Raça	Estado civil	Profissão	LESÃO			
						Topografia	Diâmetro (cm)	Tipo Histológico	Quant.
B1502	F	84	branca	viúva	pensionista	Malar E	0,3	Nodular	1
B1503	F	62	branca	casada	do lar	Couro cabeludo	0,8	Nodular	2
						Canto medial do olho E	0,3		
B1506	M	64	branca	casado	aposentado	Frontal Medial	0,5	Nodular	1
B1513	F	43	branca	casada	do lar	Supralabial E	1,3	Nodular	1
B1514	F	46	branca	solteira	do lar	Mento	0,6	Nodular	1
B1827	F	73	branca	casada	não informado	Dorso do nariz	0,2	Esclerodermiforme (Recidiva)	1
B2016	M	45	branca	casado	cozinheiro	Cervical posterior	0,5	Esclerodermiforme	1
B2115	M	50	branca	casado	pecuarista	Cervical	0,5	Esclerodermiforme	1
B2121	M	71	branca	casado	aposentado	Não informado	0,5	Esclerodermiforme (Recidiva)	1
B2306	M	66	branca	casado	carpinteiro	Mandíbula E	0,4	Superficial	1
B2386	F	33	branca	solteira	Inspetora de controle de qualidade	Lábio Superior E	0,6	Superficial	1

Continua...

Tabela 1 – Dados referentes às características dos indivíduos da amostra para avaliação dos marcadores tumorais (Ki-67, p53, survivina e p105): gênero, idade (em anos), e características da lesão (topografia, diâmetro em centímetros, tipo histológico e quantidade). (continuação)

Paciente	Gênero	Idade (anos)	Raça	Estado civil	Profissão	LESÃO			
						Topografia	Diâmetro (cm)	Tipo Histológico	Quant.
B2758	F	59	branca	casada	do lar	Temporal D	0,4	Superficial (Recidiva)	3
						Asa esquerda do nariz	0,4		
						Dorso	0,4		
B3125	M	82	branca	casado	aposentado	Parietal	0,4	Superficial	1
B6493	M	57	branca	casado	pensionista	Orelha D	1,5 x 1,0 x 0,3	Nodular (Recidiva)	2
						Orelha E	0,7 x 0,6 x 0,3		
B6813	M	66	não informado	não informado	não informado	Frontal E	1,0 x 0,5	Esclerodermiforme	1
B7433	F	66	branca	casada	do lar	Canto medial do olho E	1,2 x 0,8	Esclerodermiforme (Recidiva)	1
B7523	F	71	branca	casada	do lar	Braço D	0,4	Superficial (Recidiva)	1
B7582	M	53	branca	casado	agrônomo	Braço	0,4	Superficial	1
B7734	F	56	branca	casada	do lar	Ponta do Nariz	0,4	Esclerodermiforme	1

Continua...

Tabela 1 – Dados referentes às características dos indivíduos da amostra para avaliação dos marcadores tumorais (Ki-67, p53, survivina e p105): gênero, idade (em anos), e características da lesão (topografia, diâmetro em centímetros, tipo histológico e quantidade). (continuação)

Paciente	Gênero	Idade (anos)	Raça	Estado civil	Profissão	LESÃO			
						Topografia	Diâmetro (cm)	Tipo Histológico	Quant.
B7794	F	68	amarela	viúva	manicure	Ângulo Naso-labial	0,3	Esclerodermiforme	1
B9077	M	36	branca	solteiro	auxiliar de serviços gerais	Occipital	0,6	Superficial	1
B9330	F	74	branca	viúva	agente de vigilância sanitária	Dorso	0,3	Superficial	1
B9543	F	83	branca	casada	aposentada	Cervical	0,2	Superficial (Recidiva)	1
B9780	F	60	branca	viúva	do lar	Asa esquerda do nariz	0,5	Esclerodermiforme	1
B10254	M	65	branca	casado	encarregado administrativo	Não especificado	0,3	Superficial (Recidiva)	1
B11358	M	37	branca	casado	representante comercial	Tórax	1,0	Superficial (Recidiva)	1
B11437	F	91	não informado	não informado	não informado	Dorso	1,2	Superficial (Recidiva)	2

As 100 amostras analisadas foram compostas por 50 unidades de tecido de epiderme normal, com as demais distribuídas entre cada tipo de tecido tumoral (Tabela 2).

Tabela 2 - Número de unidades amostrais obtidas para cada tipo de célula utilizada.

<b>Tipo de célula</b>	<b>Número de pacientes</b>	<b>Porcentagem (%)</b>
Superficial	6	6,0
Nodular	18	18,0
Esclerodermiforme	6	6,0
Recidiva	20	20,0
Epiderme	50	50,0
<b>Total</b>	<b>100</b>	<b>100,0</b>

Como a maioria das amostras não apresentou distribuição normal, todas as representações gráficas utilizadas foram feitas com medianas e quartis.

Com exceção do marcador p105, todos os demais mostraram diferenças estatisticamente significativas nas respostas para cada tipo da amostra estudada, pelos modelos lineares generalizados. Os resultados das expressões de cada marcador encontram-se sumarizados na Tabela 3, na qual pode-se observar a mediana e quartis da expressão de cada marcador em cada tipo celular estudado.

Tabela 3 - Mediana, primeiro quartil (percentil 25) e terceiro quartil (percentil 75) dos valores de respostas dos marcadores utilizados neste estudo para cada tipo de célula estudado. Valores em negrito seguidos da letra **a** indicam respostas estatisticamente diferentes daquelas de células esclerodermiforme, e valores em negrito seguidos da letra **b** indicam respostas estatisticamente diferentes daquelas de células da epiderme.

Marcador	Células da epiderme			Células tumorais											
				Esclerodermiforme			Nodular			Superficial			Recidiva		
	Mediana	P 25	P 75	Mediana	P 25	P 75	Mediana	P 25	P 75	Mediana	P 25	P 75	Mediana	P 25	P 75
Ki-67	<b>0,08<sup>a</sup></b>	0,06	0,10	<b>0,17<sup>b</sup></b>	0,13	0,21	0,09	0,06	0,12	0,09	0,05	0,18	0,13	0,08	0,16
p53	0,08	0,02	0,26	0,05	0	0,15	<b>0,22<sup>a</sup></b>	0,04	0,62	<b>0,63<sup>a,b</sup></b>	0,18	0,72	<b>0,25<sup>a</sup></b>	0,03	0,58
Survivina citoplasmática	<b>0,10<sup>a</sup></b>	0,03	0,23	<b>0<sup>b</sup></b>	0	0	<b>0<sup>b</sup></b>	0	0	<b>0<sup>b</sup></b>	0	0	<b>0<sup>b</sup></b>	0	0,01
Survivina nuclear	<b>0,02<sup>a</sup></b>	0,01	0,07	<b>0<sup>b</sup></b>	0	0,01	<b>0,01<sup>b</sup></b>	0	0,02	<b>0<sup>b</sup></b>	0	0	<b>0<sup>b</sup></b>	0	0,03
p105	124,67	108,67	150,33	150	122,67	159,67	149,67	115,67	168	132,17	101,67	189,67	143,00	127	152,67

## 5.1 Expressão do Ki-67

Os dados com as marcações do Ki-67 não se ajustaram à distribuição normal, e após inspeção visual pelos diagramas Q-Q foram avaliados com um modelo linear generalizado com distribuição de erros Gamma e função de ligação Identidade, que indicou diferenças estatisticamente significativas entre os tipos de CBC, recidivas e epiderme normal ( $p < 0,01$ ).

As células da epiderme normal foram menos marcadas que as células dos subtipos tumorais, mas estas diferenças só foram estatisticamente significativas (pelo teste Sidak sequencial) em relação aos esclerodermiformes. Além destas, não foram encontradas quaisquer outras diferenças estatisticamente significativas (Tab. 4 e Fig. 9).

Tabela 4: Resultados dos testes *post-hoc* de Sidak sequencial, comparando as expressões do marcador Ki-67. As diferenças estatisticamente significativas entre pares estão marcadas em negrito.

<b>Grupo</b>	<b>Comparação</b>	<b>Diferença média</b>	<b>Erro padrão</b>
Epiderme	Esclerodemiforme	<b>-0,088</b>	<b>0,018</b>
	Nodular	-0,046	0,023
	Recidiva	-0,053	0,020
	Superficial	-0,035	0,027
Esclerodemiforme	Epiderme	<b>0,088</b>	<b>0,018</b>
	Nodular	0,042	0,029
	Recidiva	0,035	0,026
	Superficial	0,053	0,032
Nodular	Esclerodemiforme	-0,042	0,029
	Epiderme	0,046	0,023
	Recidiva	-0,007	0,030
	Superficial	0,011	0,035
Recidiva	Esclerodemiforme	-0,035	0,026
	Epiderme	0,053	0,020
	Nodular	0,007	0,030
	Superficial	0,018	0,033
Superficial	Esclerodemiforme	-0,053	0,032
	Epiderme	0,035	0,027
	Nodular	-0,011	0,035
	Recidiva	0,035	0,026

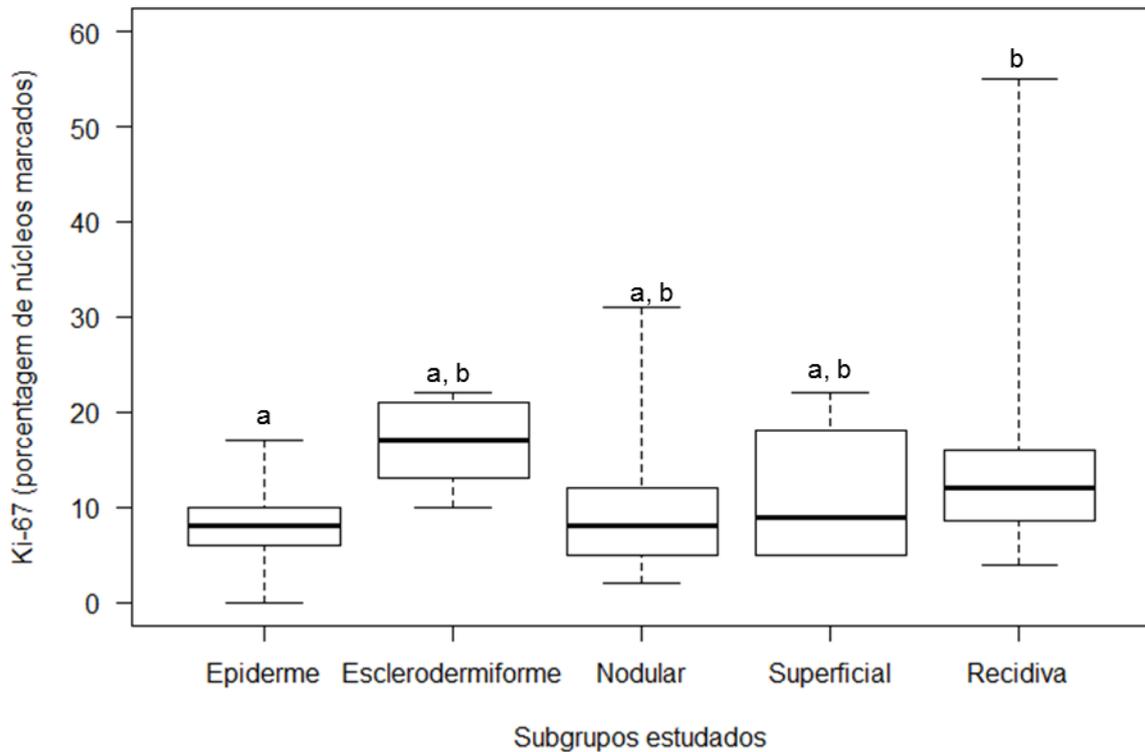


Figura 9: Expressão do marcador Ki-67. As barras horizontais representam a mediana, as caixas representam os quartis e as linhas tracejadas se estendem até os valores mínimo e máximo. Subgrupos representados por letras diferentes diferem estatisticamente entre si ( $p < 0,05$ ).

## 5.2 Expressão do p53

A marcação do p53 também não se ajustou à distribuição normal, e após inspeção visual pelos diagramas Q-Q foi avaliada por um modelo com distribuição de erros Gamma em função de ligação Identidade, que mostrou diferenças estatisticamente significativas entre as amostras ( $p < 0,01$ ). As células da epiderme normal mostraram valores significativamente menores que dos tumores superficiais (Tab. 5).

Tabela 5: Resultados dos testes post-hoc de Sidak sequencial, comparando as expressões do marcador p53. As diferenças estatisticamente significativas entre pares estão marcadas em negrito.

<b>Grupo</b>	<b>Comparação</b>	<b>Diferença média</b>	<b>Erro padrão</b>
Epiderme	Esclerodemiforme	0,089	0,037
	Nodular	-0,195	0,075
	Recidiva	-0,170	0,088
	Superficial	<b>-0,356</b>	0,114
Esclerodemiforme	Epiderme	-0,089	0,037
	Nodular	<b>-0,284</b>	<b>0,076</b>
	Recidiva	<b>-0,259</b>	<b>0,089</b>
	Superficial	<b>-0,445</b>	<b>0,115</b>
Nodular	Esclerodemiforme	<b>0,284</b>	<b>0,076</b>
	Epiderme	0,195	0,075
	Recidiva	0,025	0,111
	Superficial	-0,161	0,132
Recidiva	Esclerodemiforme	<b>0,259</b>	<b>0,089</b>
	Epiderme	0,170	0,088
	Nodular	-0,025	0,111
	Superficial	-0,185	0,140
Superficial	Esclerodemiforme	<b>0,445</b>	<b>0,115</b>
	Epiderme	<b>0,356</b>	<b>0,114</b>
	Nodular	0,161	0,132
	Recidiva	0,185	0,140

A marcação dos esclerodermiformes mostrou valores estatisticamente menores que as dos tumores nodulares, superficiais e recidivas. Não foram estatisticamente diferentes, apenas em relação à epidermenormal (Tab. 5, Fig. 10).

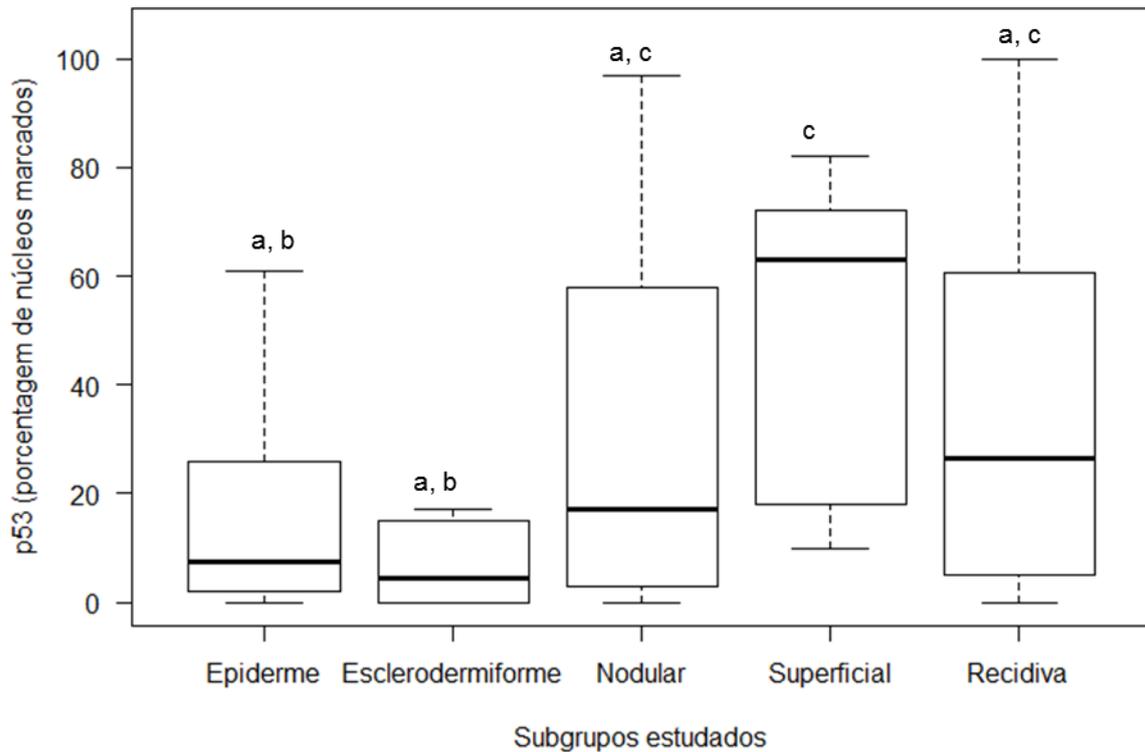


Figura 10: Expressão do marcador p53. As barras horizontais representam a mediana, as caixas representam os quartis e as linhas tracejadas se estendem até os valores mínimo e máximo. Subgrupos representados por letras diferentes diferem estatisticamente entre si ( $p < 0,05$ ).

### 5.3 Expressão da Survivina Nuclear

As marcações da survivina nuclear também não se ajustaram à distribuição normal, e após inspeção visual pelos diagramas Q-Q foram analisadas por um modelo linear generalizado com distribuição de erros Tweedie e função de ligação Log, a qual mostrou diferenças estatisticamente significativas entre os tipos de CBC, recidivas e epiderme normal ( $p < 0,01$ ) (Tab. 6).

A marcação da epiderme normal foi maior que a dos subtipos analisados, que não apresentaram diferenças estatisticamente significativas nas respostas a este marcador (Tab. 6; Fig. 11).

Tabela 6: Resultados dos testes post-hoc de Sidak sequencial, comparando as expressões do marcador survivina nuclear. As diferenças estatisticamente significativas entre pares estão marcadas em negrito.

<b>Grupo</b>	<b>Comparação</b>	<b>Diferença média</b>	<b>Erro padrão</b>
Epiderme	Esclerodemiforme	<b>0,036</b>	<b>0,009</b>
	Nodular	<b>0,041</b>	<b>0,007</b>
	Recidiva	<b>0,029</b>	<b>0,009</b>
	Superficial	<b>0,032</b>	<b>0,008</b>
Esclerodemiforme	Epiderme	<b>-0,036</b>	<b>0,009</b>
	Nodular	0,005	0,006
	Recidiva	-0,007	0,009
	Superficial	-0,003	0,007
Nodular	Esclerodemiforme	-0,005	0,006
	Epiderme	<b>-0,041</b>	<b>0,007</b>
	Recidiva	-0,012	0,007
	Superficial	-0,009	0,005
Recidiva	Esclerodemiforme	0,007	0,009
	Epiderme	<b>-0,029</b>	<b>0,009</b>
	Nodular	0,012	0,007
	Superficial	0,003	0,008
Superficial	Esclerodemiforme	0,003	0,007
	Epiderme	<b>-0,032</b>	<b>0,008</b>
	Nodular	0,009	0,005
	Recidiva	-0,003	0,008

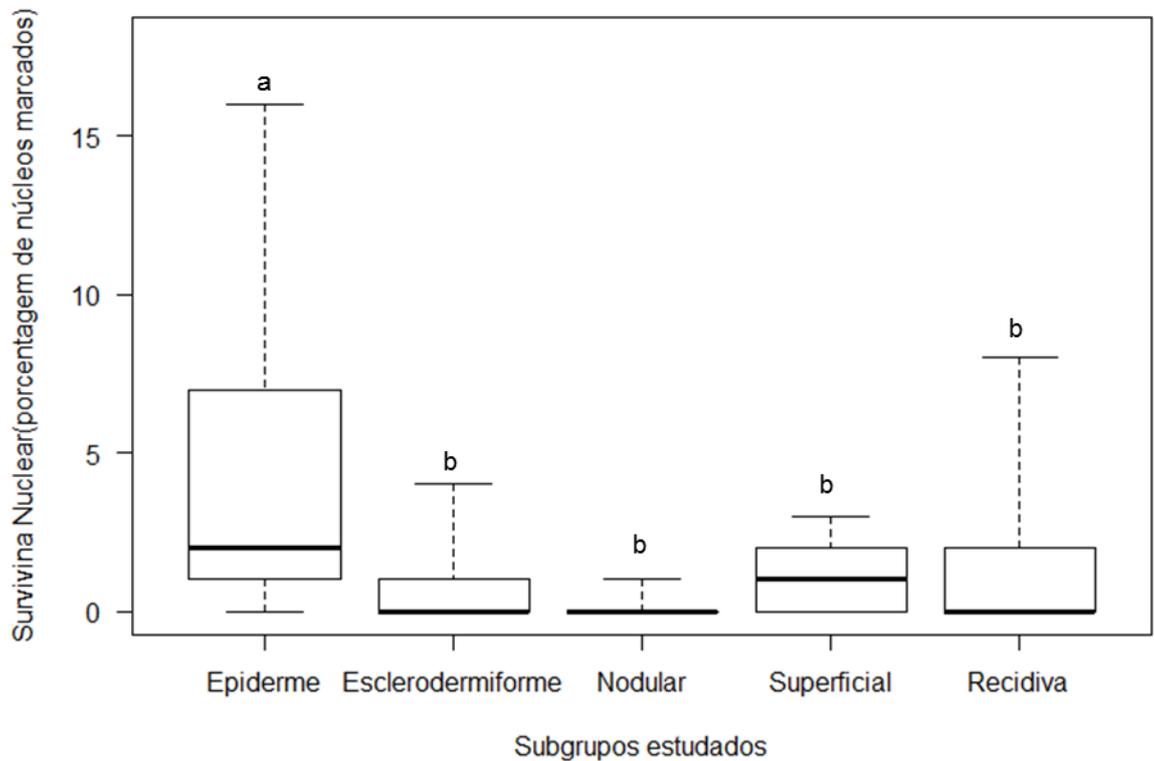


Figura 11 - Expressão da Survivina Nuclear. As barras horizontais representam a mediana, as caixas representam os quartis e as linhas tracejadas se estendem até os valores mínimo e máximo. Subgrupos representados por letras diferentes diferem estatisticamente entre si ( $p < 0,05$ ).

#### 5.4 Expressão da Survivina Citoplasmática

As marcações da survivina citoplasmática também não se ajustaram à distribuição normal, e após inspeção visual pelos diagramas Q-Q foram analisadas por um modelo linear generalizado com distribuição de erros Tweedie e função de ligação Log.

Seu resultado foi bastante similar aos apresentados pela Survivina Nuclear, mostrando diferenças estatisticamente significativas entre os tipos de CBC, recidivas e epiderme normal ( $p < 0,01$ ) (Tab. 7). Assim como o outro tipo de Survivina, a marcação da epiderme foi maior que a dos subtipos analisados, que não

apresentaram diferenças estatisticamente significativas nas respostas a este marcador (Tab. 7; Fig. 12).

Tabela 7: Resultados dos testes post-hoc de Sidak sequencial, comparando as expressões do marcador survivina citoplasmática. As diferenças estatisticamente significativas entre pares estão marcadas em negrito.

<b>Grupo</b>	<b>Comparação</b>	<b>Diferença média</b>	<b>Erro padrão</b>
Epiderme	Esclerodemiforme	<b>0,143</b>	<b>0,020</b>
	Nodular	<b>0,143</b>	<b>0,019</b>
	Recidiva	<b>0,134</b>	<b>0,020</b>
	Superficial	<b>0,148</b>	<b>0,019</b>
Esclerodemiforme	Epiderme	<b>-0,143</b>	<b>0,020</b>
	Nodular	0,000	0,006
	Recidiva	-0,009	0,009
	Superficial	0,005	0,005
Nodular	Esclerodemiforme	0,000	0,006
	Epiderme	<b>-0,143</b>	<b>0,019</b>
	Recidiva	-0,009	0,008
	Superficial	0,005	0,003
Recidiva	Esclerodemiforme	0,009	0,009
	Epiderme	<b>-0,134</b>	<b>0,020</b>
	Nodular	0,009	0,008
	Superficial	0,014	0,007
Superficial	Esclerodemiforme	-0,005	0,005
	Epiderme	<b>-0,148</b>	<b>0,019</b>
	Nodular	-0,005	0,003
	Recidiva	-0,014	0,007

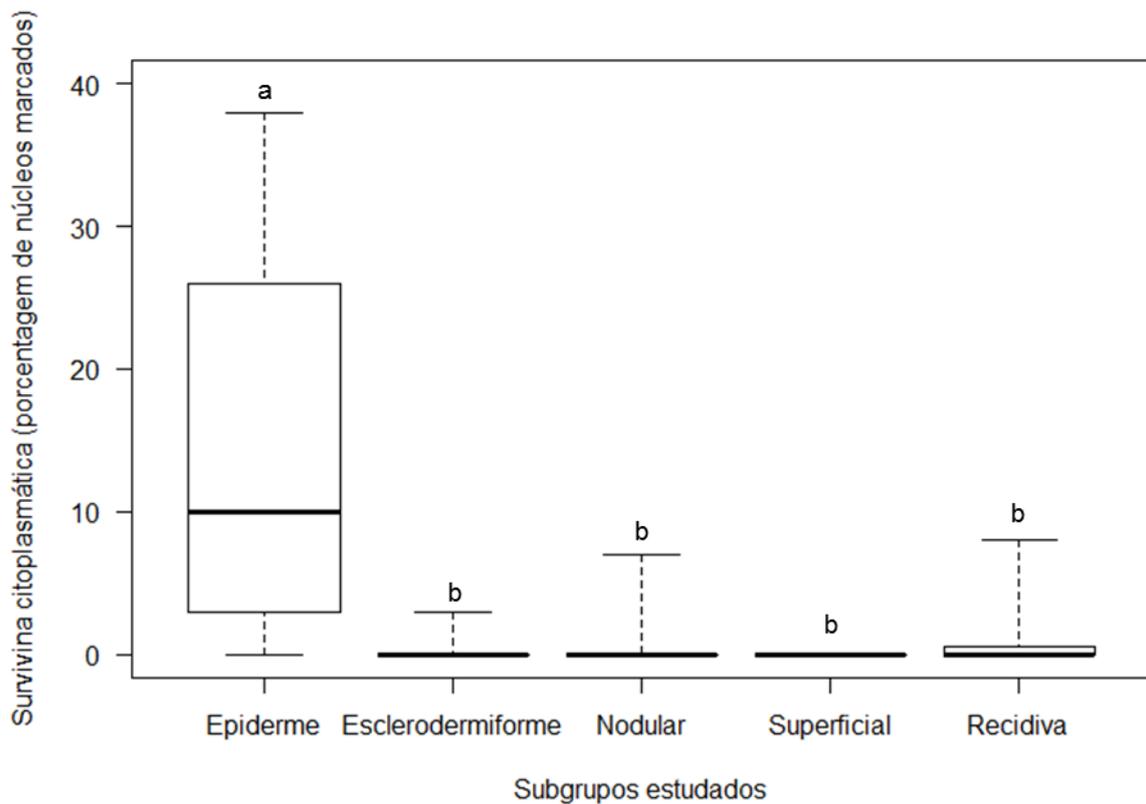


Figura 12 - Expressão da Survivina Citoplasmática. As barras horizontais representam a mediana, as caixas representam os quartis e as linhas tracejadas se estendem até os valores mínimo e máximo. Subgrupos representados por letras diferentes diferem estatisticamente entre si ( $p < 0,05$ ).

### 5.5 Expressão do p105

A marcação do p105 se ajustou à distribuição normal, de forma que foi analisada por um modelo linear generalizado gaussiano (distribuição de erros normal e função de ligação Identidade), uma vez que esta parte dos dados foi considerada como normal pelo teste de Shapiro-Wilk de normalidade (Tab. 8).

Tabela 8: Resultados dos testes *post-hoc* de Sidak sequencial, comparando as expressões do marcador p105. As diferenças estatisticamente significativas entre pares estão marcadas em negrito.

<b>Grupo</b>	<b>Comparação</b>	<b>Diferença média</b>	<b>Erro padrão</b>
Epiderme	Esclerodemiforme	-11,698	11,837
	Nodular	-13,878	8,489
	Recidiva	-17,039	8,830
	Superficial	-15,033	17,696
Esclerodemiforme	Epiderme	11,698	11,837
	Nodular	-2,180	13,273
	Recidiva	-5,340	13,494
	Superficial	-3,335	20,427
Nodular	Esclerodemiforme	2,180	13,273
	Epiderme	13,878	8,489
	Recidiva	-3,161	10,680
	Superficial	-1,155	18,688
Recidiva	Esclerodemiforme	5,340	13,494
	Epiderme	17,039	8,830
	Nodular	3,161	10,680
	Superficial	2,005	18,845
Superficial	Esclerodemiforme	3,335	20,427
	Epiderme	15,033	17,696
	Nodular	1,155	18,688
	Recidiva	-2,005	18,845

A expressão do p105 não mostrou nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os subtipos de CBC, as recidivas e a epiderme normal ( $p=0,21$ ), evidenciando-se que este marcador não apresentou diferenças evidentes entre os subgrupos estudados (Fig. 13).

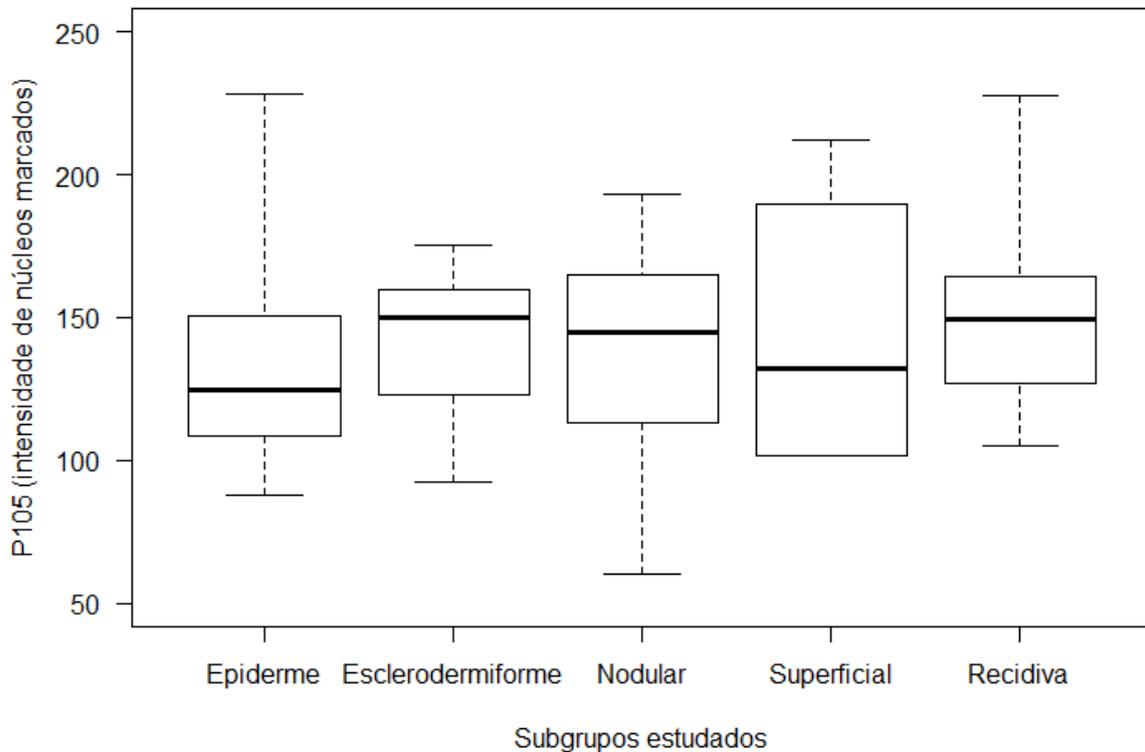


Figura 13: Expressão do marcador p105. As barras horizontais representam a mediana, as caixas representam os quartis e as linhas tracejadas se estendem até os valores mínimo e máximo. Não há diferenças estatisticamente significativas.

### 5.6 Razão entre as expressões de Ki-67 e p53

Na avaliação da razão entre as expressões dos marcadores Ki-67 e p53, os resultados foram maiores para as células tumorais esclerodermiformes em relação a todos os demais tipos celulares. As células da epiderme apresentaram valores estatisticamente menores que os subtipos esclerodermiforme e nodular, mas maiores que o subtipo superficial, e não se diferenciando das recidivas. As células do subtipo tumoral superficial apresentaram valores menores que todos os demais subtipos e que as células da epiderme (Tabela 9 e Figura 14).

Tabela 9: Resultados dos testes *post-hoc* de Sidak sequencial, comparando a razão entre as expressões do marcador Ki-67 em relação ao p53. Não houve diferenças estatisticamente significativas entre pares.

<b>Grupo</b>	<b>Comparação</b>	<b>Diferença média</b>	<b>Erro padrão</b>
Epiderme	Esclerodemiforme	<b>-511,849</b>	<b>142,579</b>
	Nodular	<b>-61,161</b>	<b>18,518</b>
	Recidiva	-13,933	13,595
	Superficial	<b>23,412</b>	<b>4,790</b>
Esclerodemiforme	Epiderme	<b>511,849</b>	<b>142,579</b>
	Nodular	<b>450,688</b>	<b>143,618</b>
	Recidiva	<b>497,916</b>	<b>143,067</b>
	Superficial	<b>535,261</b>	<b>142,500</b>
Nodular	Esclerodemiforme	<b>-450,688</b>	<b>143,618</b>
	Epiderme	<b>61,161</b>	<b>18,518</b>
	Recidiva	47,228	21,962
	Superficial	<b>84,573</b>	<b>17,902</b>
Recidiva	Esclerodemiforme	<b>-497,916</b>	<b>143,067</b>
	Epiderme	13,933	13,595
	Nodular	-47,228	21,962
	Superficial	<b>37,345</b>	<b>12,743</b>
Superficial	Esclerodemiforme	<b>-535,261</b>	<b>142,500</b>
	Epiderme	<b>-23,412</b>	<b>4,790</b>
	Nodular	<b>-84,573</b>	<b>17,902</b>
	Recidiva	<b>-37,345</b>	<b>12,743</b>

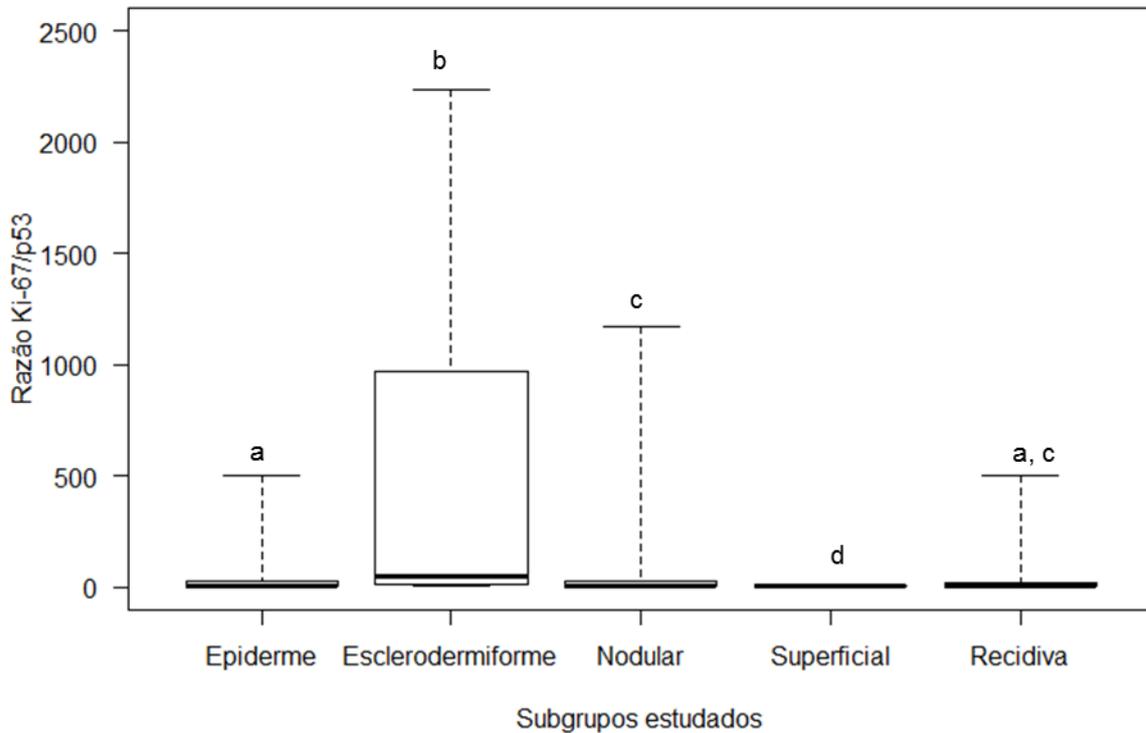


Figura 14: Razão entre as expressões dos marcadores Ki-67 e p53. As barras horizontais representam a mediana, as caixas representam os quartis e as linhas tracejadas se estendem até os valores mínimo e máximo. Subgrupos representados por letras diferentes diferem estatisticamente entre si ( $p < 0,05$ ).

### 5.7 Razão entre as expressões de Ki-67 e Survivina Nuclear

Na avaliação da razão entre as expressões dos marcadores Ki-67 e Survivina Nuclear, os resultados foram estatisticamente menores para as células normais da epiderme em relação a todos os subtipos tumorais, e nenhuma outra diferença estatisticamente significativa foi detectada (Tabela 10 e Figura 15).

Tabela 10: Resultados dos testes *post-hoc* de Sidak sequencial, comparando a razão entre as expressões do marcador Ki-67 em relação ao marcador Survivina Nuclear. Não houve diferenças estatisticamente significativas entre pares.

<b>Grupo</b>	<b>Comparação</b>	<b>Diferença média</b>	<b>Erro padrão</b>
Epiderme	Esclerodemiforme	<b>-1296,646</b>	<b>361,433</b>
	Nodular	<b>-896,438</b>	<b>141,408</b>
	Recidiva	<b>-620,214</b>	<b>145,284</b>
	Superficial	<b>-1029,26</b>	<b>308,522</b>
Esclerodemiforme	Epiderme	<b>1296,646</b>	<b>361,433</b>
	Nodular	400,208	387,283
	Recidiva	676,432	388,715
	Superficial	267,386	474,529
Nodular	Esclerodemiforme	-400,208	387,283
	Epiderme	<b>896,438</b>	<b>141,408</b>
	Recidiva	276,224	201,151
	Superficial	-132,821	338,438
Recidiva	Esclerodemiforme	-676,432	388,715
	Epiderme	<b>620,214</b>	<b>145,284</b>
	Nodular	-276,224	201,151
	Superficial	-409,045	340,076
Superficial	Esclerodemiforme	-267,386	474,529
	Epiderme	<b>1029,260</b>	<b>308,522</b>
	Nodular	132,821	338,438
	Recidiva	409,045	340,076

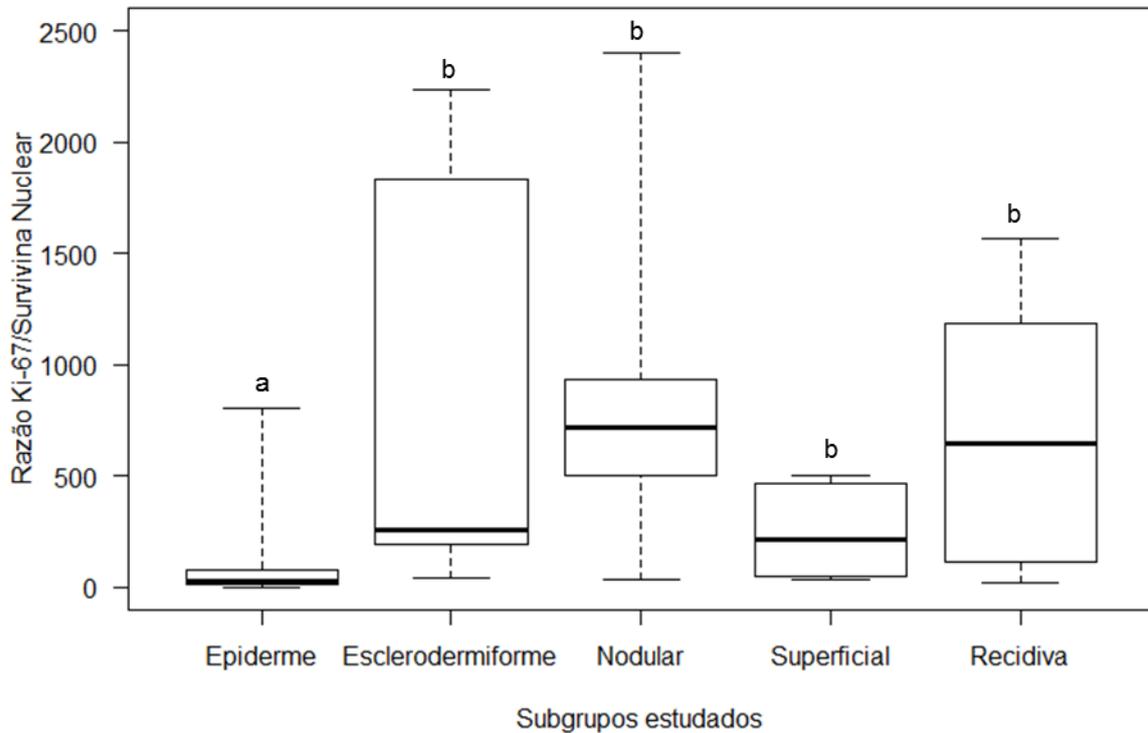


Figura 15: Razão entre as expressões dos marcadores Ki-67 e Survivina Nuclear. As barras horizontais representam a mediana, as caixas representam os quartis e as linhas tracejadas se estendem até os valores mínimo e máximo. Subgrupos representados por letras diferentes diferem estatisticamente entre si ( $p < 0,05$ ).

### 5.8 Correlações entre os marcadores

As correlações das expressões entre os marcadores nos subtipos de CBC, recidivas e epiderme normal mostraram uma pequena correlação estatisticamente significativa entre os marcadores p53 e Ki-67, e uma forte correlação entre os dois tipos de Survivina (Tab.11).

Tabela 11: Matriz de correlação de Spearman entre os marcadores considerando todos os tipos de células. Valores de correlação em negrito são estatisticamente significativas com  $p < 0,01$ .

Marcadores	Ki-67	p53	Surv. Nuclear	Surv. Citop.	p105
ki-67	1				
p53	<b>0,298</b>	1			
Survivina Nuclear	0,032	-0,023	1		
Survivina Citoplasmática	-0,055	-0,113	<b>0,699</b>	1	
p105	-0,037	0,004	-0,191	-0,091	1

Na epiderme a correlação entre Ki-67 e p53 mostrou-se estatisticamente significativa pela correlação de Spearman, mas o valor de correlação encontrado fica maior, indicando uma correlação moderada entre estes dois marcadores. Ainda considerando apenas as células da epiderme, há uma pequena correlação entre os marcadores Ki-67 e Survivina Citoplasmática, e uma moderada correlação entre os dois tipos de Survivina (Tab.12).

Finalmente, quando analisados os tumores, houve uma moderada correlação estatisticamente significativa entre a expressão dos dois tipos de Survivina e do Ki-67, além de uma correlação entre os dois tipos de Survivina. Além destas, nenhuma outra foi considerada estatisticamente significativa pela correlação de Spearman (Tab.13).

Tabela 12: Matriz de correlação de Spearman entre os marcadores considerando apenas as células de Epiderme. Valores de correlação em negrito são estatisticamente significativas com  $p < 0,01$ .

Marcadores	Ki-67	p53	Surv. Nuclear	Surv. Citop.	p105
ki-67	1				
p53	<b>0,476</b>	1			
Survivina Nuclear	0,199	0,234	1		
Survivina Citoplasmática	<b>0,317</b>	0,153	<b>0,555</b>	1	
p105	-0,227	-0,006	0,076	0,139	1

Tabela 13: Matriz de correlação de Spearman entre os marcadores considerando apenas as células tumorais. Valores de correlação em negrito são estatisticamente significativas com  $p < 0,01$ .

Marcadores	Ki-67	p53	Surv. Nuclear	Surv. Citop.	p105
ki-67	1				
p53	0,102	1			
Survivina Nuclear	<b>0,372</b>	0,046	1		
Survivina Citoplasmática	<b>0,295</b>	-0,116	<b>0,539</b>	1	
p105	-0,068	-0,071	-0,133	-0,104	1

## 5.9 Análise de Correspondência Múltipla

A análise do mapa percentual (Figura 16, explicação de 70% da variância), identifica um padrão de expressão individualizado para os diferentes subgrupos, quando analisados conjuntamente. Formas nodulares se associaram a maiores valores de p105 e menores de survivina. A epiderme apresentou maiores valores de survivina, porém, intermediários de Ki-67, em proximidade com esclerodermiformes e recidivas, que se aproximaram dos maiores valores de p53 e p105. As recidivas se assemelham aos esclerodermiformes quanto à expressão dos marcadores de proliferação e apoptose.

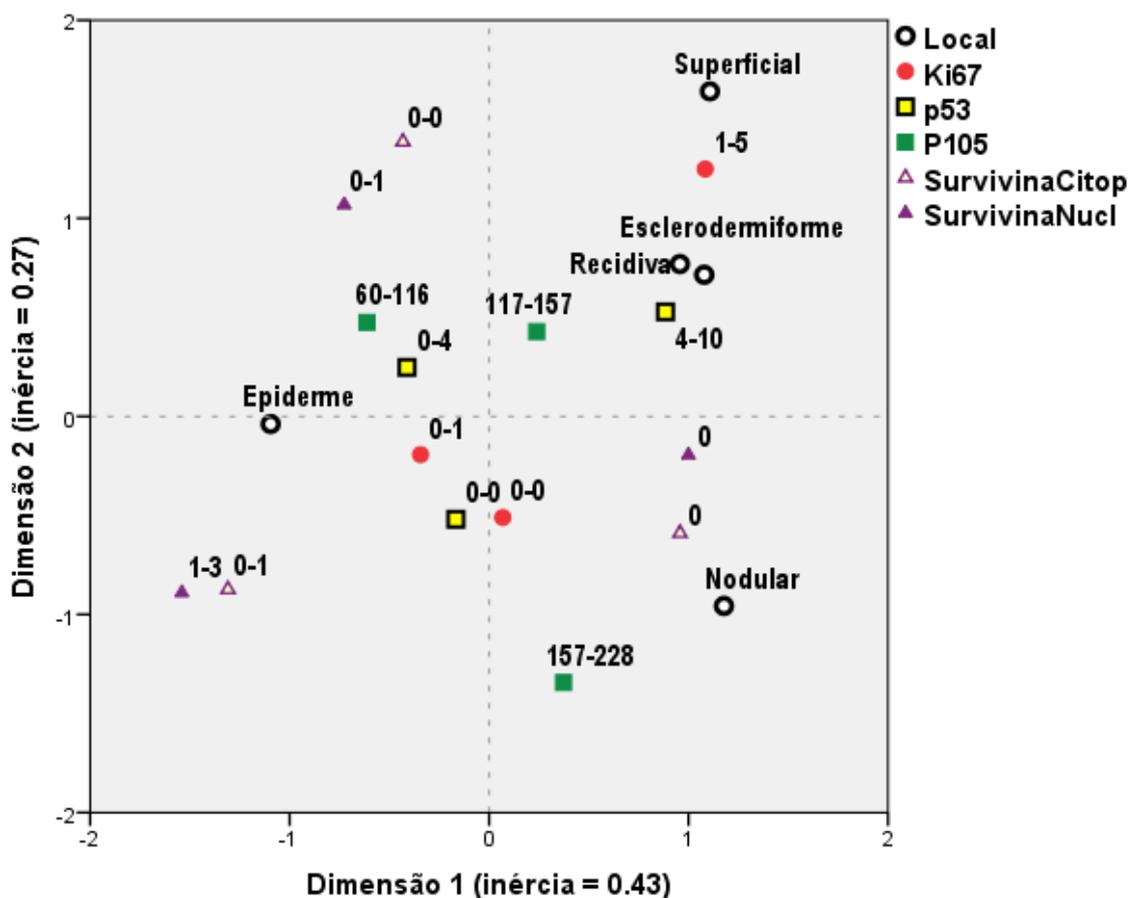


Figura 16: Mapa perceptual da Análise de Correspondência Múltipla. Os círculos pretos representam os tipos celulares estudados, e os demais símbolos representam a intensidade de resposta de cada marcador.

## ***6. Discussão***

## 6. Discussão

No presente estudo foi comparada a expressão de imunomarcadores relacionados aos fatores de proliferação (Ki-67) e à apoptose (p53, survivina e NF- $\kappa$ B), em indivíduos portadores de carcinomas basocelulares, em tumores recidivados, e ainda na epiderme normal.

A marcação do Ki-67 foi altamente expressa nos CBCs esclerodermiformes, seguida pelos nodulares. Em outros estudos, autores avaliaram a expressão do Ki-67 nas variantes histológicas de CBCs e nas recidivas, e não encontraram uma correlação estatística significativa ( $p=0,617$ ) (Kramer *et al.*, 2014). Essa condição de instabilidade tem sido reconhecida por autores que estudaram este marcador em tumores de mesma natureza, como Corrêa *et al.* (2009), que afirma que o Ki-67 apresenta comportamento instável, uma vez que apresentou nível de significância baixo, entre 4 e 23%, tendo sido mais expresso nos subtipos nodular e superficial.

Já para Batinac *et al.* (2004), a expressão do Ki-67 revelou importante evidência de proliferação celular, quando comparado a expressão no carcinoma espinocelular (CEC) e ceratosa actínica (CA). Neste estudo, houve um padrão similar na expressão do Ki-67 e do p53, sugerindo uma associação entre a proliferação celular e a expressão de p53. A expressão do Ki-67 e a não expressão de Bcl2, no grupo carcinoma espinocelular, pareceu indicar que no CEC houve uma intensificação da atividade proliferativa. Mas, no que se referiu à CA, a maior expressão do p53, em relação a do Ki-67, possibilitou indicar uma redução da apoptose, nesse tipo de lesão, facilitando a perpetuação de células com dano no DNA não reparado. No estudo de Dornelas *et al.* (2009), com relação ao marcador Ki-67, houve grande variedade na intensidade de marcação nas amostras de CA e CEC. Nossos resultados, tanto na análise bivariada, quanto na multivariada,

fortalece o conceito que nos subtipos esclerodermiformes e nas recidivas, a fração proliferativa dos CBCs está aumentada. Isso alerta ao comportamento mais infiltrativo nesses dois subgrupos. De fato, a taxa de recidivas cirúrgicas em neoplasias infiltrativas, entre elas o subtipo esclerodermiforme, e nas recidivas, pode ser reflexo da taxa de proliferação tumoral aumentada desses grupos.

O p53 está frequentemente alterado nos tumores humanos, incluindo o câncer de pele (Muller *et al.*, 2011). Dos tumores estudados, o subtipo superficial expressou fortemente o p53, assim como, houve expressão dessa proteína nos demais subtipos de CBCs estudados, nas recidivas, e na epiderme. Este resultado está de acordo com Corrêa *et al.* (2009) que demonstra que esse marcador se expressa mais fortemente nos casos menos invasivos, como os tumores superficiais. No estudo de Dornelas *et al.* (2009), a marcação do p53, em CA e CEC foi expressa em todos os casos avaliados, com maior intensidade nas CA. Para Kim *et al.* (2006), a expressão do p53, em lesões pré-cancerosas, como na CA, sugere que ele pode ser usado como marcador precoce de malignidade. A maior expressão do p53 no subtipo superficial, em contrapartida ao Ki-67, também importantemente expresso nesse subtipo, pode ser interpretado como uma característica de resistência à proliferação, tendo em vista que esse subtipo demora a infiltrar a derme, apresentando crescimento horizontal por longo tempo. Dessa forma, o balanço Ki-67/ p53 pode sugerir a invasividade dos subtipos estudados.

A expressão da survivina nuclear neste estudo, foi evidenciada com maior prevalência nas amostras da epiderme. Autores como Marconi *et al.* (2007), confirmaram recentemente a sua presença nos queratinócitos basais. Para Bongiovanni *et al.* (2009) e Bowen *et al.* (2004), a survivina está altamente expressa em tumores cutâneos melanomas e não melanomas comparada com a pele normal,

sendo predominante a nuclear em relação à citoplasmática. Survivina nuclear foi pouco estudada em CBC, e nunca comparada com a epiderme e com formas recidivadas. Sua alta expressão na epiderme sugere que seja uma importante via de resistência à carcinogênese, expressando-se intensamente devido ao estímulo UV. E a perda da expressão nos subtipos neoplásicos possa representar uma importante via de escape da suplantada pela carcinogênese (Adamkov, M. *et al.*, 2011).

Dentro dos tumores, a tentativa de compensação pela expressão paralela de survivina não ocorre a contento, evidenciando dois mecanismos de apoptose suplantados pela neoplasia.

Neste estudo, apesar de todas as amostras expressarem fortemente a marcação com o p105, não houve diferença significativa entre os subtipos de CBC, nas recidivas e na epiderme. Provavelmente, este marcador não seja de importância fundamental no processo de carcinogênese dos CBCs.

A via NF-kB é muito ampla e se intercepta com estímulos exógenos, vias de crescimento, inflamação e apoptose. Eventualmente, o estudo preliminar apenas da fração p105, não tenha revelado algum papel subjacente nesse processo. O p105 foi o marcador escolhido por representar a principal interseção da via NF-kB com o processo de apoptose.

O desequilíbrio entre a proliferação e as vias de apoptose são um dos fundamentos da carcinogênese, e nossos resultados sugerem que a expressão do p53 seja fundamental na progressão da neoplasia.

A correlação da imunoexpressão do Ki-67/p53 na epiderme pode refletir um campo contíguo geneticamente alterado, proliferando gradualmente sob a epiderme

normal, com crescimento e risco de transformação maligna. Esse conceito tem consequências clínicas importantes, pois esclarece a existência de várias áreas de doença pré-maligna, múltiplos locais de tumores primários sincrônicos e a presença de tumores distantes. Dessa forma, altos níveis de p53 devido a mutações e ao aumento da expressão gênica podem ser considerados marcadores biológicos do dano actínico e do campo cancerizável (Abdalla *et al.* 2014). Em paralelo, a perda da correlação de Ki-67-p53 nos subtipos tumorais podem representar o desenvolvimento da carcinogênese.

Os CBCs recidivados têm índices de recidiva muito maiores que os primários, tendem a ser mais agressivos e devem ser tratados de forma muito mais criteriosa (Terzian, 2009). De acordo com Torezan *et al.* (2013), o desenvolvimento de campos com células mutadas é considerado uma etapa crítica na carcinogênese, com importante repercussão clínica. Os resultados obtidos a partir da biologia molecular sustentam o modelo de carcinogênese, onde um campo com células geneticamente alteradas tem papel fundamental. Uma importante implicação clínica é o fato de que campos com células mutadas geralmente permanecem após a cirurgia para a remoção de um tumor primário, podendo originar novos tumores, designados como segundo tumor primário ou recorrência local, dependendo do local exato e do intervalo entre a cirurgia e a detecção deste novo tumor.

Neste estudo, houve expressão dos marcadores na epiderme em todos os casos. Essa característica parece demonstrar uma possibilidade de que a epiderme seja parte de um campo de cancerização, principalmente nos casos em que se encontra extremamente lesado pela radiação UV, o que o faz expressar vias de fuga

da carcinogênese, sinalizando a necessidade do desenvolvimento de estudos, visando a atender a esta hipótese.

## **6.1 Considerações**

Este trabalho investigou de forma inédita a expressão simultânea de alguns marcadores de proliferação e apoptose em carcinomas basocelulares, incluindo subtipos, recidivas e epiderme normal adjacente. Apesar da amostra restrita, foi possível identificar padrões de expressão que caracterizam alguns grupos e podem representar alguns de seus comportamentos biológicos.

Os padrões observados indicam a importância da atividade antiapoptótica do campo de cancerização e o resultado de sua perda nas formas invasivas de CBC, reforçando o valor da prevenção adequada contra a radiação UV.

Da mesma forma, os resultados sugerem que as recidivas de CBCs adotem um perfil de maior proliferação e perda de capacidade de apoptose, alertando para o potencial invasivo desse grupo e a importância de que o CBC seja efetivamente tratado na primeira abordagem cirúrgica.

Todos esses resultados devem ser confirmados com técnicas de biologia molecular, com amostras mais numerosas e com a investigação minuciosa de diferentes componentes das vias identificadas neste trabalho.

Da mesma forma, a investigação simultânea de formas de CBCs mistas, com mais de um componente, podem se revelar modelos para comprovar esses

resultados. Assim como, o comportamento dos diferentes subtipos de CBCs recidivados, deve ser estudado com particularidade por este grupo.

## ***7. Conclusão***

## **7. Conclusão**

- A expressão simultânea de marcadores Ki-67, p53, survivina e p105 permitiu a identificação de padrões de proliferação e apoptose, em consonância com formas recidivadas, e de forma independentemente da epiderme.
- Houve diferentes padrões de correlação entre a expressão dos marcadores da epiderme e das neoplasias.
- Existiu correlação entre Ki-67 e p53 na epiderme, entretanto, essa correlação não foi observada nas neoplasias.

## ***8. Referências***

## 8. Referências

Abdalla B, Rstom SA, Paschoal FM. Field cancerization: a review article. *Surg Cosmet Dermatol*. 2014;6:310-8.

Adamkov M, Halasova E, Rajcani J, Bencat M, Vybohova D, Rybarova S, et al. Relation between expression. Pattern of 53 and survivin in cutaneous basal cell carcinomas. *Med Sci Monit*. 2011;17:74-80.

Alberts AS, Montminy M, Shenolikar S, Feramisco JR. Expression of a peptide inhibitor of protein phosphatase 1 increases phosphorylation and activity of CREB in NIK 3T3 fibroblasts. *Mol Cell Biol*. 1994;14:4398-407.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Biologia molecular da célula*. 5a ed. Porto Alegre: Artmed; 2010. Cap 20, p. 1217-68.

American Cancer Society. Basal and squamous cell skin cancers [Internet]. Washington: American Cancer Society; 2016 [citado 20 Nov 2016]. 42 p. Disponível em: <http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/003139-pdf.pdf>

Ansarin H, Daliri M, Soltani-Arabshahi. REexpression of p53 in aggressive and non-aggressive histologic variants of basal cell carcinoma. *Eur J Dermatol*. 2006;16:543-47.

Aoyagi S, Nouri K. Difference between pigmented and nonpigmented basal cell carcinoma treated with Mohs micrographic surgery. *Dermatol Surg*. 2006;32:1375-9.

Arisawa EAL, Moraes E, Rocha RF, Almeida JD. Marcadores biológicos: PCNA e Ki-67 breve revisão. *Rev Fac Odont São José dos Campos*. 1999;2:54-60.

Artandi SE, Chang S, Lee SL, Alson S, Gottlieb GJ, Chin L, et al. Telomere dysfunction promotes non-reciprocal translocations and epithelial cancers in mice. *Nature*. 2000;406:641-5.

Auepemkiate S, Boonyaphiphat P, Thongsuksai P. P53 expression related to the aggressive infiltrate histopathological feature of basal cell carcinoma. *Histopathology*. 2002;40:568-73.

Bacher S, Schmitz ML. The NF-kappaB pathway as a potential target for autoimmune disease therapy. *Curr Pharm Des*. 2004;10:2827-37.

Bachmann F, Buechner SA, Wernli M, Strebel S, Erb P. Ultraviolet light downregulates CD95 ligand and TRAIL receptor expression facilitating actinic keratosis and squamous cell carcinoma formation. *J Invest Dermatol*. 2001;117:59-66.

Batinac T, Zamolo G, Jonjic N, Gruber F, Petrovecki M. p53 protein expression and cell proliferation in non-neoplastic and neoplastic proliferative skin diseases. *Tumori*. 2004;90:120-7.

Beikzadeh B, Delirezh N. Morphological features of cell death through microscopic view. *Res Mol Med [Internet]*. 2014[citado 20 Nov 2016];3(4):1-2 Disponível em: [http://rmm.mazums.ac.ir/browse.php?a\\_id=65&slc\\_lang=fa&sid=1&ftxt=1](http://rmm.mazums.ac.ir/browse.php?a_id=65&slc_lang=fa&sid=1&ftxt=1).

Belfiore A, Genua M, Malaguarnera R. PPAR-gamma Agonists and Their Effects on IGF-I Receptor Signaling: Implications for Cancer. *PPAR Res*. 2009 Jul 7: 830501. doi: 10.1155/2009/830501.

Ben-Porath I, Weinberg RA. The signals and pathways activating cellular senescence. *Int J Biochem Cell Biol*. 2003;37:961-76.

Ben-Porath I, Weinberg RA. When cells get stressed: An integrative view of cellular senescence. *J Clin Invest*. 2004;113:8-13.

Bongiovanni L, Muller EJ, Della Salda L. Survivin in skin pathologies. *Exp Dermatol*. 2011;20:457-63.

Bowen AR, Hanks AN, Murphy KJ, Florell SR, Grossman D. Proliferation, apoptosis, and survivin expression in keratinocytic neoplasms and hyperplasias. *Am J Dermatopathol*. 2004;26:177-81.

Brash DD, Ziegler A, Jonason AS, Simon JA, Kunala S, Leffel DJ. Sunlight and sunburn in human skin cancer: p53, apoptosis, and tumor promotion. *J Investig Dermatol Symp Proc*. 1996;1:136-42.

Brasileiro Filho G. *Bogliolo patologia*. 7a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2006. p. 224.

Brasileiro Filho G. *Bogliolo Patologia*. 9a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2016. Cap 32, p. 1542.

Braun N, Papadopoulos T, Muller-Hermelink HK. Cell Cycle dependent distribution of the proliferation-associated Ki-67 antigen in human embryonic lung cells. *Virch Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*. 1988;56:25-33.

Brown DC, Gatter KC. Monoclonal antibody Ki-67: its use in histopathology. *Histopathology*. 1990;17:489-503.

Bruno S, Darzuynkiewicz Z. Cell cycle dependent expression and stability of the nuclear protein detected by Ki-67 antibody in HL-60 cells. *Cell Prolif*. 1992;26:31-40.

Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, Luo X, Wang X. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 1999;15:269-90.

Castedo M, Perfettini JL, Roumier T, Andreau K, Medema R, Kroemer G. Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. *Oncogene*. 2004;23:2825-37.

Christian MM, Moy RL, Wagner RF, Yen-Moore A. A correlation of alpha-smooth muscle actin and invasion in micronodular basal cell carcinoma. *Derm Surg.* 2001;27(5):441-55.

Cobourne MT, Xavier GM, Depew M, Hagan L, Sealby J, Webster Z, et al. Sonic hedgehog signalling inhibits palatogenesis and arrests tooth development in a mouse model of the nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Dev Biol.* 2009;331:38-49.

Corrêa MPD, Ferreira AP, Gollner AM, Rodrigues MF, Guerra MCS. Expressão de marcadores de proliferação celular e apoptose em carcinoma basocelular. *An Bras Dermatol.* 2009;84:606-14.

Crowson AN. Basal cell carcinoma: biology, morphology and clinical implications. *Mod Pathol.* 2006;19:S127-S-147.

D'errico M, Calcagnile AS, Corona R, Fucci M, Annessi G, Baliva G, et al. p53 mutations and chromosome instability in basal cell carcinomas developed at an early or late age. *Cancer Res.* 1997;57:747-52.

Dallaglio K, Marconi A, Pincelli C. Survivin: a dual player in healthy and diseased skin. *J Invest Dermatol.* 2012;132:18-27.

Daniel PT, Schulze-Osthoff K, Belka C, Güner D. Guardians of cell death: the Bcl-2 family proteins. *Essays Biochem.* 2003;39:73-88.

Daniel PT, Wider T, Sturm I, Schulze-Osthoff K. The kiss of death: promises and failures of death receptors and ligands in cancer therapy. *Leukemia.* 2001;15:1022-32.

Dessinioti C, Antoniou C, Katsambas A, Stratigos AJ. Basal cell carcinoma: what's new under the sun. *Photochem Photobiol [Internet].* 2010 [citado 22 Nov 2016];86:481-91. Disponível em: <http://mohs.com.br/carciloma-basocelular.pdf>.

Dornelas MT, Rodrigues MF, Machado DC, Gollner AM, Ferreira AP. Expressão de marcadores de proliferação celular e apoptose no carcinoma espinocelular de pele e ceratose actínica. *An Bras Dermatol.* 2009;84:469-75.

Du Manoir MS, Guillaud P, Camus E, Seigneurin D, Brugal G. Ki-67 labeling in postmitotic cells defines different Ki-67 pathways within the 2c compartment. *Cytometry.* 1991;12:455-63.

Eberle J, Fecker LF, Forschner T, Ulrich C, Röwert-Huber J, Stockfleth E. Apoptosis pathways as promising targets for skin cancer therapy. *Br J Dermatol.* 2007;156:18-24.

Edwards MJ, Thomas RC, Wong YL. Retinoblastoma gene expression in human non-melanoma skin cancer. *J Cutan Pathol.* 2003;30:479-85.

Elder DE, Lever WF. *Lever histopatologia da pele.* 10a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2011. Cap 29, p. 751-98.

Engels IH, Totzke G, Fischer U, Schulze-Osthoff K, Jänicke RU. Caspase-10 sensitizes breast carcinoma cells to TRAIL-induced but not tumor necrosis factor-induced apoptosis in a caspase-3-dependent manner. *Mol Cell Biol.* 2005;25:2808-18.

Er E, Oliver L, Cartron PF, Juin P, Manon S, Vallette FM. Mitochondria as the target of the pro-apoptotic protein Bax. *Biochim Biophys Acta.* 2006;1757(9-10):1301-11.

Ferreira C, Rocha J. *Oncologia molecular.* São Paulo: Editora Atheneu; 2010. 770 p.

Gilmore TD. Rel/NF- $\kappa$ B Transcription factors. *Oncogene.* 1999;18:6842-44.

Goldberg LH. Basal cell carcinoma. *Lancet.* 1996;347(9002):663-67.

Grivicich I, Regner A, Rocha AB. Morte celular por apoptose. *Rev Bras Cancerol.* 2007;53:335-43.

Grossman HB. Expression of survivin, a novel inhibitor of apoptosis, in superficial transitional cell carcinoma of the bladder. *Urol Oncol.* 2004;22:265.

Hall P, Levinson D. Review: assessment of cell proliferation in histological material. *J Clin Pathol.* 1990;43:184-92.

Hartwell LH, Weinert TA. Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science.* 1989;246(4930):629-34.

Hayden MS, Ghosh S. Shared principles in NF- $\kappa$ B signaling. *Cell.* 2008;132:344-62.

Heckmann M, Zogelmeier F, Konz B. Frequency of facial basal cell carcinoma does not correlate with site-specific UV exposure. *Arch Dermatol.* 2002;138:1494-97.

Heidebrecht HJ, Buck F, Hass K, Wacker HH, Pawaresch R. Monoclonal antibodies Ki-S3 and Ki-S5 yield new data on the "Ki-67" proteins. *Cell Prolif.* 1996;29:413-25.

Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature.* 2000;407:770-6.

Hofseth LJ, Hussain SP, Harris CC. p53: 25 years after its discovery. *Trends Pharmacol Sci.* 2004;25:177-81.

Ichikawa A, Hotta T, Takagi N, Tsukita K, Kinoshita T, Nagai H, et al. Mutations of P53 gene and their relation to disease progression in B-cell lymphoma. *Blood.* 1992;79:2701-17.

Instituto Nacional de Câncer "José Alencar Gomes da Silva" (BR). Ministério da Saúde. Estimativas da incidência e mortalidade por câncer. Rio de Janeiro: INCA; 2003.

Instituto Nacional de Câncer "José Alencar Gomes da Silva" (BR). Ministério da Saúde. Tipos de Câncer: pele não melanoma [Internet]. Rio de Janeiro: INCA; 2016

[citado 8 Dez 2016]. Disponível em: [http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pele\\_ao\\_melanoma](http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pele_ao_melanoma),

Ishi LA, Pereira IC, Marques MEA, Padovani CR. Carcinoma basocelular de pálpebras – fatores relacionados com a recidiva tumoral. *An Bras Dermatol*. 2004;79:423-30.

Jacobs GH, Rippey JJ, Altini M. Prediction of aggressive behavior in basal cell carcinoma. *Cancer*. 1982;49:533-7.

Karin M, Lin A. NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat Immunol*. 2002;3:221-7.

Kill IR. Localisation of the Ki-67 antigen within the nucleolus evidence for a fibrillar-deficient region of the dense fibrillar component. *J Cell Sci*. 1996;109:1253-63.

Kim KH, Park EJ, Seo YJ, Cho HS, Kim CW, Kim KJ. Immunohistochemical study of cyclooxygenase-2 and p53 expression in skin tumors. *J Dermatol*. 2006;33:319-25.

Kopke LFF, Schmidt SM. Carcinoma basocelular. *An Bras Dermatol*. 2002;77:249-85.

Kramer E, Herman O, Frand J, Leibou L, Schreiber L, Vaknine H. Ki67 as a Biologic Marker of Basal Cell Carcinoma: a retrospective study. *Isr Med Assoc J*. 2014;16:229-32.

Kumar V, Abbas AK, Fausto N, editors. *Robbins e Cotran: Patologia: bases patológicas das doenças*. 7a ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2005. p. 1299-300.

Kurbanov BM, Geilen CC, Fecker LF, Orfanos CE, Eberle J. Efficient TRAIL-R1/DR4-mediated apoptosis in melanoma cells by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). *J Invest Dermatol*. 2005;125:1010-9.

Lascano AR, Kuznitsky R. Factores de riesgo para carcinoma basocelular. Estudio de casos-controles en Cordoba. *Medicina (B Aires)*. 2005;65:495-500.

Lear JT, Harvey I, De Berker D, Stranger RC, Fryer AA. Basal cell carcinoma. *J R Soc Med*. 1998;91:585-8.

Leffell DJ. The scientific basis of skin cancer. *J Am Acad Dermatol*. 2000;42(1 Pt 2):18-22.

Levine AJ, Perry ME, Chang A, Silver A, Dittmer D, Wu M, et al. The 1993 Walter Huber lecture: the role of the p53 tumour-suppressor gene in tumorigenesis. *Br J Cancer*. 1994;69:409-16.

Liu G, Parant JM, Lang G, Chau P, Chavez-Reyes A, ElNaggar AK, et al. Chromosome stability, in the absence of apoptosis, is critical for suppression of tumorigenesis in Trp53 mutant mice. *Nat Genet*. 2004;36:63-8.

Lloyd AC. Limits to lifespan. *Nat Cell Biol.* 2002;4:E25-7.

Lo Muzio L, Staibano S, Pannone G, Mignogna MD, Mariggio A, Salvatore G, et al. Expression of the apoptosis inhibitor survivin in aggressive squamous cell carcinoma. *Exp Mol Pathol.* 2001;70:249-54.

Lu SJ, Tiekso J, Hietanen S, Syrjänen K, Havu VK, Syrjänen S. Expression of cell-cycle proteins p53, p21 (WAF-1), PCNA and Ki-67 in benign, premalignant and malignant skin lesions with implicated HPV involvement. *Acta Derm Venereol.* 1999;79:268-73.

Luo S, Fang G, Coldiron M, Lin Y, Yu H, Kirschner MW, et al. Structure of the mad2 spindle assembly checkpoint protein and its interaction with cdc20. *Nat Struct Biol.* 2000;7:224-9.

Maia M, Guimarães P, Moraes JC. Risk factors for basal cell carcinoma: a case-control study. *Rev Saude Publica.* 1995;29:27-37.

Mantese SÃO, Berbet ALCV, Gomides MDA, Rocha A. Carcinoma basocelular – Análise de 300 casos observados em Uberlândia – MG. *An Bras Dermatol.* 2006;81:136-42.

Marconi A, Dallaglio K, Lotti R, Vaschieri C, Truzzi F, Fantini F, et al. Survivin identifies keratinocyte stem cells and is downregulated by anti-beta1 integrin during anoikis. *Stem Cell.* 2007;25:149-55.

Maximov GK, Maximov KG. The role of p53 tumor-suppressor protein in apoptosis and cancerogenesis. *Biotechnol Biotechnol Equip.* 2008;22:664-8.

Mckee PH, Calonje E, Granter SR. Pathology of the skin: with clinical correlation. 3rd ed. Philadelphia: Elsevier; 2005. 1 CD-ROM.

Menendez JA, Lupu R. Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis. *Nat Rev Cancer.* 2007;7:763-77.

Ministério da Saúde (BR). Sistema de Informação sobre mortalidade (SIM) [Internet]. Brasília: Ministério da Saúde; 2013 [citado 8 Dez 2016]. Disponível em: <http://svs.aids.gov.br/cgiae/sim/>.

Miot HA, Chinem VP. Epidemiologia do carcinoma basocelular. *An Bras Dermatol.* 2011;86:292-305.

Muller PA, Vousden KH, Norman JC. p53 and its mutants in tumor cell migration and invasion. *J Cell Biol.* 2011;192:209-18.

Naismith JH, Sprang SR. Modularity in the TNF-receptor family. *Trends Biochem Sci.* 1998; 23:74-9.

Narita M, Nunez S, Heard E, Lin AW, Hearn SA, Spector DL, et al. Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2 F target genes during cellular senescence. *Cell*. 2003;113:703-16.

Nasser N. Epidemiologia dos Carcinomas Basocelulares em Blumenau, SC, Brasil, de 1980 a 1999. *An Bras Dermatol*. 2005;80:363-8.

Okada H, Mak TW. Pathways of apoptotic and nonapoptotic death in tumour cells. *Nat Rev Cancer*. 2004;4:592-603.

Oliveira Filho JB. Mutação em NRAS causa uma síndrome de autoimune linfoproliferativa humana [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2008.

Oren M. Decision making by p53: life, death and cancer. *Cell Death Differ*. 2003;10:431-42.

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

Ouhtit A, Nakazawa H, Armstrong BK, Kricker A, Tan E, Yamasaki H, et al. UV-radiation-specific p53 mutation frequency in normal skin as a predictor of risk of basal cell carcinoma. *J Natl Cancer Inst*. 1998;90:523-31.

Ouyang W, Zhang O, Ma Q, Li J, Huang C. Cyclooxygenase-2 Induction by Arsenite through the IKKb/NFkB pathway exerts an antiapoptotic effect in mouse epidermal C141 cells. *Environ Health Perspec*. 2007;115:513-8.

Pampalona J, Frias C, Genesca A, Tussell L. Progressive telomere dysfunction causes cytokinesis failure and leads to the accumulation of polyploid cells. *PLoS Genet*. 2012;8: e1002679.

Pasternak JJ. Uma introdução   genética molecular humana. 2a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2007. p. 337-8.

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

Perkins ND. Post-translational modifications regulating the activity and function of the nuclear factor kappa B pathway. *Oncogene*. 2006;25(51):6717-30.

Perkins ND. The diverse and complex roles of NF-Kb subunits in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2012;12:121-32.

Peter ME, Krammer PH. The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death Differ*. 2003;10:26-35.

Petitjean A, Mathe E, Kato S, Ishioka C, Tavtigian SV, Hainaut P, et al. Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. *Hum Mutat.* 2007;28:622-9.

Plavetić ND, Jakić-Razumović J, Kulić H, Sirotković-Skerlev M, Barić M, Vrbanec D. prognostic value of Ki-67 in breast carcinoma: tissue microarray method versus whole section analysis- potentials and pitfalls. *Pathol Oncol Res.* 2015;21:315-24.

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

Rabenhorst SH, Burini RC, Schmitt FCL. Ciclo celular: mecanismos reguladores e marcadores bioquímicos. *Rev Bras Cancerol.* 1994;40:141-7.

Rabenhorst SH, Burini RC, Schmitt FCL. Marcadores da proliferação celular. *Rev Bras Patol Clin.* 1993;29:24-8.

Ranganath RM, Nagashree NR. Role of programmed cell death in development. *Int Rev Cytol.* 2001;202:159-242.

Rocco JW, Sidransky D. p16 (MTS-1/CDKN2/INK4a) in cancer progression. *Exp Cell Res.* 2001;264:42-55.

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

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

Sah NK, Khan Z, Khan GJ, Bisen PS. Structural, functional and therapeutic biology of survivin. *Cancer Lett.* 2006;244:164-71.

Sanchez E, Chacon I, Plaza MM, Muñoz E, Cruz MA, Martinez B, et al. Clinical outcome in diffuse large B cell lymphoma is dependent on the relationship between different cell cycle regulator proteins. *J Clin Oncol.* 1998;16:1931-9.

Sanino P, Shousha S. Demonstration of oestrogen receptors in paraffin wax sections of breast carcinoma using the monoclonal antibody 1d5 and microwave oven processing. *J Clin Pathol.* 1994;47:90-2.

Santos ABO, Loureiro V, Araújo Filho VJF, Ferraz AR. Estudo epidemiológico de 230 casos de carcinoma basocelular agressivos em cabeça e pescoço. *Rev Bras Cir Cabeça Pescoço.* 2007;36:230-3.

Saraste A, Pulkki K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc Res.* 2000;45:528-37.

Schmitt CA, Fridman JS, Yang M, Lee S, Baranov E, Hoffman RM, et al. A senescence program controlled by p53 and p16INK4a contributes to the outcome of cancer therapy. *Cell*. 2002;109:335-46.

Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol*. 2000;182:311-22.

Sen R, Baltimore D. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell*. 1986;46:705-16.

Serrano M, Blasco MA. Putting the stress on senescence. *Curr Opin Cell Biol*. 2001;13:748-75.

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

Sousa FAC, Brandão AAH, Almeida JD, Rosa LEB. Alterações gênicas e câncer bucal – uma breve revisão. *Rev Bras Patol Oral*. 2004;3:20-5.

Starborg M, Gell K, Brundell E, Höög C. The murine Ki-67 cell proliferation antigen accumulates in the nucleolar and heterochromatic regions of interphase cells and at the periphery of the mitotic chromosomes in a process essential for cell cycle progression. *J Cell Sci*. 1996;109:143-53.

Starska K, Kulig A, Lukomski M. Tumor front grading in prediction of survival and lymph node metastases in patients with laryngeal carcinoma. *Adv Med Sci*. 2006;51:200-4.

Tang JY, Mackay-Wiggan JM, Aszterbaum M, Yauch RL, Lindgren J, Chang K, et al. Inhibiting the hedgehog pathway in patients with the basal-cell nevus syndrome. *N Engl J Med*. 2012;366:2180-8.

Terzian LR. Carcinoma basocelular. In: Ramos e Silva M, Castro MCR. *Fundamentos da dermatologia*. Rio de Janeiro: Atheneu; 2009. p. 19.

Tilli CM, Van Steensel MA, Krekels GA, Neumann HA, Ramaekers FC. Molecular aetiology and pathogenesis of basal cell carcinoma. *Br J Dermatol*. 2005;152:1108-24.

Valiati AA, Pavelecini M, Netto R, Pereira Filho G, Fauri MA, Lima LP, et al. Síndrome do nevo basocelular: relato de caso. *Arq Catarin Med*. 2009;38 Supl 1:160-2.

Van Dierendonck JK, Keijzer R, van de Velde CJ, Cornelisse CJ. Nuclear distribution of the Ki-67 antigen during the cell cycle: comparison with growth fraction in human breast cancer cells. *Cancer Res*. 1989;49:2999-3006.

Verhelst K, Carpentier I, Beyaert R. Regulation of TNF-induced NF-kappaB activation by different cytoplasmic ubiquitination events. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2011;22(5-6):277-86.

Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surtin the p53 network. *Nature.* 2000;408(6810):307-10.

Xie D, Zeng YX, Wang HJ, Wen JM, Tao Y, Sham JS, et al. Expression of cytoplasmic and nuclear Survivin in primary and secondary human glioblastoma. *Br J Cancer.* 2006;94:108-14.

Zaffaroni N, Daidone MG. Survivin expression and resistance to anticancer treatments: perspectives for a new therapeutic intervention. *Drug Resist Update.* 2002;5:65-72.

Zaffaroni N, Pennati M, Daidone MG. Survivin as a target for new anticancer interventions. *J Cell Mol Med.* 2005;9:360-72.

Zhang L, Altuwaijri S, Deng F, Chen L, Lal P, Bhanot UK, et al. NF-kappaB regulates androgen receptor expression and prostate cancer growth. *Am J Pathol.* 2009;175:489-99.

Ziegler U, Groscurth P. Morphological features of cell death. *News Physiol Sci.* 2004;19:124-8.

## **9. *Apêndices***

## **9. Apêndices**

### **9.1: Detalhamento da Técnica de Imuno-histoquímica.**

#### **9.1.1 Preparação das amostras**

Os blocos incluídos em parafina foram seccionados em micrótomo rotativo semiautomático da Leica, com navalhas de aço inox, para obtenção de 80 cortes na espessura de 3  $\mu\text{m}$ . Em seguida, os cortes foram estendidos em lâminas histológicas de vidro fosco, de bordas esmerilhadas, previamente revestidas com uma camada de solução de organo-silano e devidamente identificadas.

Os quatro anticorpos primários (marcadores) utilizados nesse estudo foram os seguintes: Ki-67 (clone MIB1) e p53 (clone DO-7), ambos fabricados pela Dako, em solução pronta para uso; survivina (fabricante Dako / clone 12C4) e NF-kB (p105) (fabricante Abcam / clone E381) em diluições respectivamente, de 1:50 (fabricados pelo Dako) e 1:250 (fabricado pela Abcam).

Como anticorpo secundário/terciário foi utilizado Labelled Polymer Flex/HRP (Dako) e o sistema de revelação foi realizado pelo cromógeno 3,3-diaminobenzidine (DAB – Dako).

#### **9.1.2 Recuperação Antigênica**

Para a recuperação antigênica pelo calor, foi utilizado o equipamento PT-LINK (Dako) com as soluções de pH alto (Dako) para p53 e p105, e de pH baixo (Dako) para Ki67 e survivina por 20 minutos, após atingir a temperatura de 95°C.

### **9.1.3 Desparafinização**

Os cortes dos tecidos foram desparafinizados durante a recuperação antigênica no equipamento PT-LINK (Dako).

### **9.1.4 Reação de Imuno-histoquímica Automatizada**

A reação de imuno-histoquímica automatizada utilizando o equipamento Dako Link 48, ocorreu em 13 (treze) etapas a seguir descritas:

- 1 - Bloqueio da peroxidase endógena através da incubação das lâminas em solução de peróxido de hidrogênio a 3% (Dako) por 5 minutos;
- 2 - Lavagem em solução Salina Tamponada;
- 3 - Incubação dos anticorpos primários por 20 minutos a 4°C em câmara úmida;
- 4 - Lavagem em solução Salina Tamponada;
- 5 - Incubação do anticorpo conjugado (secundário e terciário) por 20 minutos em temperatura ambiente;
- 6 - Lavagem em solução Salina Tamponada;
- 7 - Revelação pelo cromógeno 3,3-diaminobenzidine (DAB – Dako) por 10 minutos;
- 8 - Lavagem em solução Salina Tamponada;
- 9 - Contra Coloração em Giemsa (Dako) por 5 minutos;
- 10 - Lavagem em água destilada;
- 11 - Desidratação em etanol absoluto;
- 12 - Xilol;
- 13 - Montagem com lamínulas em resina sintética e secagem.

## 9.2: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa.



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Expressão de fatores de proliferação e antiapoptóticos em carcinomas basocelulares

**Pesquisador:** Jacqueline Brito

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 24015214.5.0000.5411

**Instituição Proponente:**

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 551.338

**Data da Relatoria:** 10/03/2014

#### Apresentação do Projeto:

Trata-se de um projeto de pesquisa de doutorado. O carcinoma basocelular (CBC) é a neoplasia maligna mais comum entre os homens e sua incidência está aumentando em nosso meio. Pode se manifestar como lesão nodular, superficial, esclerodermiforme, micronodular e fibroepitelioma de Pinkus: os dois primeiros de baixa agressividade. O CBC é um carcinoma de baixa mortalidade, porém com elevada morbidade devido ao potencial destrutivo local e as elevadas taxas de reincidência. As diferenças evolutivas dos diversos tipos de carcinomas basocelulares não são bem definidas. A análise de fatores de proliferação e apoptose pode subsidiar o conhecimento sobre a fisiopatologia e as diferenças evolutivas dessas lesões. Não há na literatura investigações sobre a expressão diferencial de fatores de proliferação (Ki-67) e relacionados à apoptose (p53, survivina e NF-KB) dos diferentes subtipos de carcinomas basocelulares e ainda tumores recidivados

#### Objetivo da Pesquisa:

**Objetivo Primário:**

Avaliar a expressão de marcadores de proliferação celular e apoptose em carcinomas basocelulares dos tipos nodular, superficial, esclerodermiforme

**Endereço:** Chácara Butignolli, s/n

**Bairro:** Rubião Junior

**CEP:** 18.618-970

**UF:** SP **Município:** BOTUCATU

**Telefone:** (14)3880-1608

**E-mail:** capellup@fmb.unesp.br



Continuação do Parecer: 551.338

e tumores recidivados.

Objetivo Secundário:

1. Comparar a expressão diferencial dos marcadores p53, Ki-67, Survinina e p105/50 (NF-KB) em subgrupos de carcinomas basocelulares e tumores recidivados. 2. Explorar a correlação entre a expressão dos marcadores p53, Ki-67, Survinina e p105/50 (NF-KB) em subgrupos de carcinomas basocelulares e tumores recidivados.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Riscos:

Como estudo preliminar e original envolvendo esses marcadores, o presente projeto não considera subtipos menos comuns de CBC como o micronodular ou fibroepitelioma de Pinkus, que podem apresentar comportamentos diferentes intrinsecamente. A identificação de padrões de dissimilaridade entre os principais subtipos histológicos exige a exploração desses subgrupos. Subtipos pigmentados foram também excluídos do estudo, apesar de que, biologicamente sejam bem representados pelos tipos nodulares. Nessa fase preliminar, foi optado pela homogeneidade dos grupos e a representatividade dos mais frequentes. Da mesma forma, não foram explorados CBCs de diferentes estadiamentos ou tamanhos, que podem apresentar modificações biológicas decorrentes do maior tempo, surgimento de clones mais aberrantes e de sua própria história natural.

Benefícios:

Trata-se de investigação inédita desses parâmetros nos subtipos de carcinoma basocelular e sua descrição tem interesse científico.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Será conduzido um estudo tipo transversal envolvendo 120 carcinomas basocelulares divididos em 30 nodulares (ou sólidos), 30 superficiais, 30 esclerodermiformes e 30 neoplasias que resultaram em recidiva. Todos com menos de 2 cm de diâmetro (estadiamento I) Os tumores serão selecionados entre os registrados no serviço de patologia da Faculdade de Medicina da Unesp de Botucatu, nos anos de 2012 a 2013, a partir dos relatórios de exames histopatológicos. Serão selecionados tumores com subtipos histológicos

**Endereço:** Chácara Butignolli , s/n

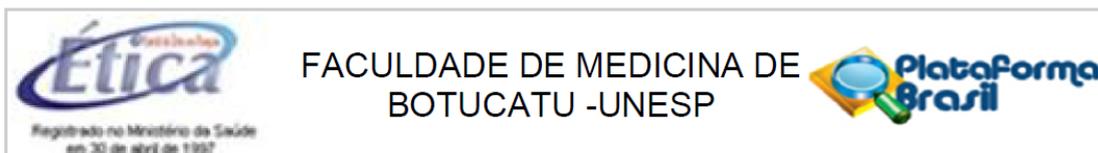
**Bairro:** Rubião Junior

**CEP:** 18.618-970

**UF:** SP **Município:** BOTUCATU

**Telefone:** (14)3880-1608

**E-mail:** capellup@fmb.unesp.br



FACULDADE DE MEDICINA DE  
BOTUCATU -UNESP

Continuação do Parecer: 551.338

únicos para a amostra de CBC nodulares, superficiais e esclerodermiformes. As lâminas histológicas desses espécimes serão submetidas ao protocolo de marcação imuno-histoquímica (DAB) para os marcadores Ki-67, p53, survivina e NF-KB. As reações de cada anticorpo serão realizadas no mesmo momento, sob mesmo protocolo. Controles positivos e negativos das marcações serão realizados para cada anticorpo. Há descrição da análise estatística dos dados.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

São apresentados todos os documentos exigidos por este CEP. Os autores solicitam dispensa do TCLE por se tratar de material já coletado e que será reanalisado.

**Recomendações:**

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Projeto pode ser aprovado sem necessidade de envio à CONEP

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Projeto de Pesquisa aprovado em reunião do CEP de 10/03/2014, sem necessidade de envio à CONEP.

Alertamos aos Pesquisadores (as) sobre a obrigatoriedade de apresentar ao CEP via Plataforma Brasil, o "RELATÓRIO FINAL DE ATIVIDADES DO ESTUDO", tão logo o mesmo seja concluído.

BOTUCATU, 11 de Março de 2014

---

**Assinador por:**  
**Trajano Sardenberg**  
**(Coordenador)**

**Endereço:** Chácara Butignolli, s/n

**Bairro:** Rubião Junior

**UF:** SP

**Município:** BOTUCATU

**CEP:** 18.618-970

**Telefone:** (14)3880-1608

**E-mail:** capellup@fmb.unesp.br



FACULDADE DE MEDICINA DE  
BOTUCATU -UNESP

Continuação do Parecer: 551.338

**Endereço:** Chácara Butignolli , s/n  
**Bairro:** Rubião Junior **CEP:** 18.618-970  
**UF:** SP **Município:** BOTUCATU  
**Telefone:** (14)3880-1608 **E-mail:** capellup@fmb.unesp.br