

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA - CAMPUS DE BOTUCATU**

**EXPRESSÃO DE FATORES ANTIAPOPTÓTICOS E DE
PROLIFERAÇÃO EM QUERATOSES ACTÍNICAS**

JULIANO VILAVERDE SCHMITT

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista – UNESP, para obtenção do título de Doutor em Patologia.

BOTUCATU – SP

2012

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA - CAMPUS DE BOTUCATU**

**EXPRESSÃO DE FATORES ANTIAPOPTÓTICOS E DE
PROLIFERAÇÃO EM QUERATOSES ACTÍNICAS**

**DOUTORANDO: JULIANO VILAVERDE SCHMITT
ORIENTADOR: HÉLIO AMANTE MIOT**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista – UNESP, para obtenção do título de Doutor em Patologia.

BOTUCATU – SP

2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE*

Schmitt, Juliano Vilaverde.

Expressão de fatores antiapoptóticos e de proliferação em queratoses actínicas / Juliano Vilaverde Schmitt. – Botucatu : [s.n.], 2012

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Hélio Amante Miot

Capes: 40101029

1. Dermatologia. 2. Pele – Doenças - Patogênese. 3. Ceratose. 4. Carcinoma de células escamosas.

Palavras-chave: Ácido acetilsalicílico; Apoptose; Carcinoma de células escamosas; Ceratose actínica; Epidemiologia; Imuno-histoquímica; Raios ultravioleta.

Sumário

Agradecimentos	6
Índice de abreviaturas.....	7
Resumo	8
1. Introdução	10
2. Primeiro manuscrito	11
3. Objetivos	31
3.1. Objetivos gerais	31
3.2. Objetivos específicos	31
4. Segundo manuscrito	32
5. Terceiro manuscrito.....	52
6. Conclusões gerais.....	70
7. Perspectivas.....	71
8. Apêndices	73
9. Anexos	75

*Dedico este trabalho às duas mulheres da
minha vida, Eneida e Marina.
O carinho e a presença de vocês foi essencial
para manter-me firme nesta trajetória,
trazendo alegria e motivação para enfrentar
todos os desafios das nossas vidas.
Amo vocês!*

Agradecimentos

Agradeço de forma muito especial o meu orientador, professor e amigo Hélio Amante Miot por todos os ensinamentos que me proporcionou de forma incansável, o auxílio gigantesco que permitiu a execução deste trabalho e a amizade que trouxe momentos e lembranças extremamente agradáveis. Não tenho como descrever a gratidão que devo aos amigos Hélio e Luciane, por sempre terem me recebido de forma cordial e gentil.

Agradeço aos meus pais, Julio e Sandra e a minha irmã Luciana por sempre me apoiarem e estarem do meu lado, sempre me socorrendo nos momentos mais difíceis.

Agradeço aos meus sogros, Antonio Augusto e Maria , por todo o apoio que sempre me deram, oferecendo vossa casa quando em minhas viagens entre Curitiba e Botucatu e por oferecerem o carinho e companhia também às mulheres da minha vida, Eneida e Marina, quando eu estava ausente.

Agradeço a todas as pessoas da pós-graduação do departamento de patologia, em especial à secretária Vânia, que sempre me recebeu prestativamente com um sorriso no rosto.

Agradeço a todos os amigos, colegas e professores do departamento de Dermatologia, que decisivamente me ajudaram e ser o que hoje sou e por mostrarem-me o quão fascinante pode ser esta especialidade médica.

Agradeço a Fundação Pró-Hansen por ter proporcionado um ótimo ambiente de trabalho, essencial para a realização do presente estudo.

Agradeço aos pacientes que ofereceram seu tempo, suas histórias e até seus corpos para a efetiva realização deste trabalho.

Agradeço a todos que porventura eu tenha esquecido, porém auxiliaram de qualquer forma na realização desta tarefa.

Índice de abreviaturas

- AAS – Ácido acetilsalicílico.
- AINH – Anti-inflamatórios não-hormonais.
- CBC – Carcinoma basocelular.
- CEC – Carcinoma espinocelular.
- CEP – Comitê de ética em pesquisa.
- COX-2 – Ciclo-oxigenase tipo 2.
- DNA – Ácido desoxirribonucleico.
- FPS – Fator de proteção solar.
- HE – Coloração histoquímica de hematoxilina e eosina.
- HPV – Papilomavírus humano.
- HSCORE – Escore semiquantitativo de marcação imuno-histoquímica nuclear.
- IECA – Inibidores da enzima conversora da angiotensina.
- MMSS – Membros superiores.
- MSD – Membro superior direito.
- MSE – Membro superior esquerdo.
- NF- $\kappa\beta$ – Fator nuclear kappa beta.
- NIQ – Neoplasia intraepitelial queratinocítica.
- OR – *Odds ratio* (razão de chances).
- PCR – *Polymerase chain reaction* (reação de cadeia da polimerase).
- QA – Queratose actínica.
- RR – Risco relativo.
- RUV – Radiação ultravioleta.
- UV – Ultravioleta.
- UNESP – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.
- UVA – Radiação ultravioleta A.
- UVB – Radiação ultravioleta B.

Resumo

Queratoses actínicas são neoplasias formadas por proliferações atípicas de queratinócitos com potencial de transformação em carcinoma espinocelular que se desenvolvem em áreas fotoexpostas da pele, são induzidas principalmente pela radiação ultravioleta e constituem marcadores de exposição solar crônica.

Danos nas vias de apoptose favorecem a proliferação celular e manutenção das lesões. Dentre as diversas vias de sinalização celular, moléculas envolvidas na resposta inflamatória mostraram-se relacionadas à carcinogênese. Além disso, estudos clínicos e laboratoriais verificaram efeito preventivo de anti-inflamatórios não hormonais no desenvolvimento de várias neoplasias.

Com o objetivo de avaliar vias de proliferação, apoptose e inflamação, além da influência do uso regular de ácido acetilsalicílico no desenvolvimento de queratoses actínicas, este estudo foi composto de dois experimentos.

O primeiro experimento avaliou a expressão de marcadores de proliferação, resistência a apoptose e inflamação nas lesões de queratoses actínicas, pele normal fotoexposta e fotoprottegida.

Obtiveram-se fragmentos de queratoses actínicas, pele fotoexposta perilesional, e fotoprottegida axilar. As amostras foram submetidas à marcação imunoistoquímica para p53, survivina, Ki-67, p105/p50 e COX-2. Marcações nucleares foram mensuradas pelo HSCORE e as citoplasmáticas pela fração de campos marcados. O grau de atipia dos foi estimado pela classificação de neoplasia intraepitelial queratinocítica (NIQ).

Foram avaliadas 38 queratoses actínicas em 13 pacientes. Os marcadores Ki-67, p53, COX-2 e survivina foram menos expressos na pele normal fotoprottegida em comparação com as lesões de QAs ($p < 0,05$). Evidenciou-se expressão de fatores de atividade inflamatória e antiapoptótica na pele fotoexposta. Houve correlação positiva entre o grau de atipia e os marcadores p53, Ki-67, COX-2 e survivina ($p < 0,05$), assim como entre a marcação para COX-2 com p53, survivina e Ki-67 ($p < 0,05$).

O segundo experimento procurou investigar a influência do uso oral regular de ácido acetilsalicílico na prevalência de queratoses actínicas.

Foi conduzido um estudo tipo caso-controle com pacientes do ambulatório de dermatologia, maiores de 50 anos, sem evidência de imunocomprometimento. Os casos foram definidos como os que estavam em uso regular de ácido acetilsalicílico oral, por

mais de seis meses consecutivos. Avaliaram-se: idade, gênero, fototipo, tabagismo, uso de medicamentos, ocorrência de câncer de pele pessoal ou familiar, hábitos de fotoproteção e exposição solar. Foram contadas queratoses actínicas na região medial da face e nos membros superiores.

Foram avaliados 74 casos e 216 controles. Casos diferiram dos controles quanto à idade mais elevada, maior prevalência do uso de inibidores da enzima conversora da angiotensina e menor número de queratoses faciais e dos membros superiores ($p < 0,05$). A análise multivariada evidenciou que uso de ácido acetilsalicílico associou-se a menores contagens de queratoses actínicas faciais (eritematosas e hipertróficas) e eritematosas dos membros superiores ($p < 0,05$), independentemente dos demais fatores de risco.

Os experimentos evidenciaram que a expressão de fatores proliferativos, inflamatórios e antiapoptóticos se correlacionaram positivamente com o grau de displasia da epiderme, e foram maiores nas lesões de queratose actínica que nos epitélios normais fotoexposto e fotoprotégido. Da mesma forma, o uso regular de ácido acetilsalicílico oral associou-se à menor prevalência de queratoses actínicas, especialmente as faciais e eritematosas.

Palavras-chave: Ceratose actínica, Apoptose, Epidemiologia, Raios Ultravioleta, Neoplasias, Carcinoma de Células Escamosas, Ácido Acetilsalicílico.

1. Introdução

Queratoses actínicas (QAs) são neoplasias pré-malignas da pele comuns na população de pele clara, induzidas pela radiação ultravioleta (RUV) e que podem evoluir para carcinoma espinocelular. Sua incidência aumenta em função da idade e constituem o quarto mais frequente diagnóstico em consultórios dermatológicos no Brasil.

A RUV constitui o agente ambiental mais importante na dermatologia, induzindo o desenvolvimento de inúmeras dermatoses inflamatórias, fotoenvelhecimento e dano genômico cujo efeito pode iniciar e promover a carcinogênese cutânea.

Dessa forma, as investigações comparativas das QAs, pele adjacente fotoexposta e fotoprottegida, podem ser exploradas como modelos *in anima nobile* de fotocarcinogênese, subsidiando estudos de risco epidemiológico, prevenção e terapêutica.

A integridade e efetividade dos sistemas de apoptose são importantes para a homeostase dos tecidos, além de atuar na defesa antitumoral. Ocorre uma complexa e intrincada rede metabólica celular com múltiplas vias moleculares, interagindo entre si e atuando em funções diferentes da célula, que controla a proliferação celular e apoptose. Algumas vias inicialmente relacionadas à inflamação mostraram-se também ligadas a tais processos celulares e ao desenvolvimento de neoplasias.

O estudo dos fenótipos, exposições e comportamentos de risco para o desenvolvimento de QAs, aliado à pesquisa de substâncias que interfiram com proliferação, inflamação e apoptose de queratinócitos pode levar ao desenvolvimento de atitudes de prevenção primária, além de abordagens que possam evitar ou interferir com a carcinogênese cutânea e de mucosas.

Este trabalho apresenta: uma revisão bibliográfica sobre aspectos clínicos e epidemiológicos das QAs; um estudo da expressão epitelial de fatores de proliferação, inflamação e resistência a apoptose nas QAs, pele fotoexposta e fotoprottegida; além de um estudo epidemiológico comparando, entre outros fatores de risco, a contagem de QAs em pacientes usuários regulares de ácido acetilsalicílico e controles.

2. Primeiro manuscrito

Título: Epidemiologia das queratoses actínicas.

Title: *Epidemiology of actinic keratosis.*

Autores:

Juliano Vilaverde Schmitt (1) – julivs@gmail.com

Hélio Amante Miot (1) – heliomiot@fmb.unesp.br

(1) Departamento de Dermatologia e Radioterapia da Faculdade de Medicina de Botucatu, Unesp.

Autor correspondente:

Prof. Hélio Amante Miot

Departamento de Dermatologia, S/N

Faculdade de Medicina da UNESP

Campus Universitário de Rubião Jr.

18618-970 - Botucatu - SP – Brasil

heliomiot@fmb.unesp.br

Resumo:

Queratoses actínicas são neoplasias formadas por proliferações atípicas de queratinócitos com potencial de transformação em carcinoma espinocelular. Desenvolvem-se em áreas fotoexpostas da pele, são induzidas principalmente pela radiação ultravioleta e constituem marcadores de exposição solar crônica. Acometem indivíduos adultos e idosos, de fototipos claros, representando o quarto diagnóstico mais comum em consultas dermatológicas no Brasil. Danos nas vias de apoptose do epitélio fotoexposto favorecem a proliferação celular e manutenção das lesões. Nesta revisão os autores reúnem os principais dados epidemiológicos sobre a doença e defendem que estratégias de identificação de fenótipos de risco, diagnóstico precoce, tratamento adequado, seguimento clínico, incentivo ao autoexame da pele, fotoeducação e fotoproteção devem

ser promovidas, a fim de evitar a evolução das lesões, além de prevenir e diagnosticar neoplasias concomitantes, igualmente induzidas pela radiação solar.

Palavras-chave: Ceratose actínica, Apoptose, Epidemiologia, Raios Ultravioleta, Neoplasias, Carcinoma de Células Escamosas.

Abstract:

Actinic keratosis are benign skin neoplasms constituted by atypical proliferation of keratinocytes that may evolve to squamous cell carcinoma. They rise at skin photoexposed areas, are induced mainly by ultraviolet radiation and depict cutaneous markers of chronic sunlight exposition. Occurs specially in adults and elders, fair skinned individuals, and accounts for the fourth common diagnosis in dermatologic consultations in Brazil. Damage of apoptosis mechanisms at photoexposed epithelium favors cellular proliferation and the surveillance of the lesions. In this revision, authors assemble the main epidemiological data regarding this disease and suggest that strategies of identification of risky phenotypes, early diagnosis, adequate treatment, clinical follow-up, stimulus to autoexamination, photoeducation and photoprotection should be promoted with the aim to avoid malignancy development and also to prevent and diagnose other neoplasm induced by ultraviolet radiation.

Key-words: Actinic keratosis; Apoptosis; Epidemiology; Ultraviolet rays; Neoplasms; Carcinoma, Squamous cell.

Introdução

Queratoses (ou ceratoses) actínicas (QAs), queratoses solares ou queratoses senis são neoplasias benignas formadas por proliferações atípicas de queratinócitos, comuns nas áreas fotoexpostas da população de pele clara, adulta e idosa. São induzidas principalmente pela radiação ultravioleta (RUV) e podem evoluir para carcinoma espinocelular (CEC), constituindo-se as lesões pré-malignas mais comuns da humanidade.^{1,2}

Foram descritas por Dubreuilh em 1826, e sua natureza precursora de CEC já é reconhecida há mais de um século.³⁻⁵

QAs são expressões fenotípicas do fotoenvelhecimento cutâneo, junto com rugas profundas e de repouso, perda da elasticidade da pele, atrofia, telangiectasias e

alterações da pigmentação; podem, ainda refletir a fotoexposição crônica dos indivíduos.^{6,7}

Frequência

QAs constituem fração significativa da prática dermatológica, sendo considerada a segunda causa de consulta médica com dermatologistas nos Estados Unidos da América.⁸ Conforme um estudo observacional neste país, de 1990 a 1999, foram diagnosticadas em 47 milhões de consultas, correspondendo a 14% das visitas ao dermatologista.⁹

Em casuística brasileira no ano de 2006, QA foi o quarto mais frequente diagnóstico entre 57.343 consultas, ocorrendo em 5,1% dos atendimentos, variando entre 7,4% na região Sul e 2,9% na região Norte.¹⁰ Outro estudo transversal realizado na França em 2008 também identificou 4,7% de diagnósticos de QAs entre os 78.300 atendimentos dermatológicos.¹¹

QA é uma condição frequente na população adulta, principalmente após os 50 anos de idade. Na Austrália, estima-se que 40-50% da população acima dos 40 anos apresente pelo menos uma lesão.¹² Ainda, um estudo italiano mostrou que os pacientes apresentaram, em média, seis a oito QAs na primeira consulta dermatológica.¹³

Pacientes com QAs tipicamente possuem múltiplas lesões, refletindo o dano actínico ao “campo de cancerização”. Este conceito sugere que a pele aparentemente normal, circunvizinha à área de QA, já apresentaria alterações genéticas associadas à carcinogênese.^{14,15}

Em investigação populacional realizada em 567 adultos (maiores que 30 anos de idade) de uma comunidade de origem japonesa no interior do Estado de São Paulo, encontrou-se uma prevalência de QAs de 13,4%, cuja idade média de início das lesões foi de 69 anos.¹⁶ Por outro lado, um estudo italiano com mais de 12 mil participantes acima de 45 anos de idade, obteve uma prevalência de apenas 1,4%, evidenciando que múltiplos fatores genéticos e ambientais devem interferir no risco de desenvolvimento de QAs.¹³

Há indícios que a incidência de QAs esteja aumentando nas últimas décadas, apesar de que estudos com metodologias adequadas não foram ainda conduzidos para identificar essa tendência, ou ainda, excluir o papel do aumento da longevidade nesse panorama. Uma recente pesquisa sul-coreana que analisou os atendimentos

ambulatoriais dermatológicos retrospectivamente por 16 anos apontou aumento de 2,14 vezes na incidência de QAs em relação à última década do século passado.¹⁷

Fisiopatogênese

QAs se desenvolvem principalmente como consequência da exposição prolongada à RUV em indivíduos susceptíveis.

Um estudo Holandês com 966 pacientes verificou risco aumentado tanto para exposição crônica, quanto para queimaduras solares sofridas antes dos 20 anos de idade.¹⁸

Consideram-se fatores secundariamente relacionados ao risco de desenvolvimento de QAs: idade avançada, gênero masculino, local de nascimento com maior índice ultravioleta, grupo étnico caucasoide, história de neoplasias cutâneas prévias, ocupação exposta ao sol, menor nível socioeconômico e fototipos claros.¹⁹

A maior incidência de QAs e CECs entre transplantados e outros imunossuprimidos fortalece a importância da eficiência das vias intrínsecas de apoptose e controle da proliferação celular na prevenção da carcinogênese cutânea.²⁰⁻²⁴

RUV é considerada um carcinógeno completo, pois atua na iniciação e promoção de neoplasias epiteliais, como ocorre nas QAs.^{3,25} A avaliação espectral indica que UVB (290-320 nm) é o comprimento de onda mais lesivo para o DNA dos queratinócitos, contudo, acredita-se que UVA (320-400 nm) poderia aumentar os danos causados pelo UVB por induzir a produção de espécies de oxigênio reativo, imunossupressão e estímulo proliferativo parácrino proveniente dos fibroblastos.²⁶

Ocasionalmente, QAs podem ser causadas por raios X e radioterapia, além disso, observou-se a ocorrência de lesões muito semelhantes, histologicamente, às QAs em áreas cronicamente expostas à radiação térmica (eritema *ab igne*).^{27,129}

A exposição artificial à RUV pela fototerapia também está associada ao maior risco de QAs e CECs (46% e 19%), principalmente nos tratamentos com doses cumulativas altas de psoralênico e UVA (PUVA).²⁸

Especificamente, a UVB provoca a formação de dímeros de timidina no DNA (ligações covalentes C=C) e no RNA que levariam principalmente à mutação nos genes da telomerase e no gene supressor tumoral p53.^{15,25,29,30}

Alterações das vias da proteína p53 promovem angiogênese e suprimem apoptose, o que permite o crescimento e proliferação de queratinócitos mutados, com potencial maligno. Observou-se que mutações no gene da proteína p53 são mais frequentes em

lesões iniciais criando um ambiente permissivo para proliferação celular e mutações em outras proteínas dessa via (p16 e Ha-ras) em lesões mais avançadas.^{15,22,31}

Enquanto a enzima ciclo-oxigenase tipo 1 apresenta expressão constitucional na pele, a ciclo-oxigenase tipo 2 (COX-2) tem efeitos basicamente pró-inflamatórios e se expressa em situações patológicas. Porém, inflamação é considerada um componente crítico da tumorigênese,³² e COX-2 está superexpressa em várias neoplasias. Além disso, há evidências de que COX-2 exerça importante função na carcinogênese cutânea.³³

Ratos transgênicos com elevada produção de COX-2 são mais suscetíveis a tumores cutâneos induzidos pela RUV, enquanto ratos deficientes em COX-2 têm uma taxa de tumores de pele 75% menor que ratos normais.^{34,35} Em humanos, a presença de QAs inflamadas está mais associada a progressão para carcinoma.³⁶

Além de estimular a proliferação celular e a angiogênese, demonstrou-se que a elevação da COX-2 está relacionada com a resistência a apoptose em vários tumores, tais como colo-retal, mama, pulmão e próstata. A atividade dessa enzima se mostrou correlacionada com a expressão de proteínas antiapoptóticas da família Bcl2.^{37,38}

Wu e Nijsten encontraram expressão significativamente elevada de COX-2 em lesões de CEC (40%), doença de Bowen (22%) e QAs (31%) em comparação com a pele normal.^{39,40} Adicionalmente, verificou-se que a indução tumoral causada pelo arsênico utiliza vias dependentes da COX-2 e fator nuclear KappaB.⁴¹

Survivina é uma proteína inibidora de apoptose que participa de diferentes vias, especialmente a Wnt/ β -catenina. Survivina se manifesta especialmente nas lesões iniciais da carcinogênese epitelial, nas células-tronco tumorais. Sua expressão foi identificada na camada basal de QAs e de forma difusa no epitélio de CECs, refletindo a atividade antiapoptótica necessária para a manutenção das neoplasias.^{42,43}

A proteína p63 é homóloga à p53, e presente em queratinócitos replicantes. Nas QAs, apresenta franca positividade em todas as camadas, evidenciando sua proliferação aberrante. Sua independência funcional e fisiopatogênica é sugerida pelo padrão de expressão independente do Ki-67 e p53.⁴³⁻⁴⁶ Já a proteína p16, que representa uma quinase dependente de ciclina envolvida na supressão do ciclo celular, apresenta expressão diferencial entre a doença de Bowen e QA.⁴⁷

Alterações numéricas e estruturais nos cromossomos envolvendo a banda cromossomal 3p13, a região centromérica do cromossomo 3 e a perda de heterozigotidade de 4 ou mais *loci* já foram identificadas.¹⁵ Da mesma forma, identificaram-se aberrações numéricas no proto-oncogene MYC e no gene do receptor do

fator de crescimento epitelial em QA e principalmente CEC, havendo correlação entre o grau de alteração genética e de anaplasia celular das lesões.^{48,49}

O processo inflamatório que circunda as lesões de QA também parece estar envolvido na progressão destas lesões para carcinoma, havendo uma mudança no perfil do infiltrado inflamatório com a progressão da doença. Verificou-se que lesões de CEC apresentam mais células CD10+ (fibroblastos), mais células dendríticas imaturas e linfócitos com fenótipo supressor (CD4*CD25* Tregs) e menos células de Langerhans no infiltrado perilesional se comparadas a lesões de QA.^{50,51}

Não é claro o papel dos vírus no desenvolvimento de QAs. A associação com infecção por papilomavírus (HPV) já foi estabelecida para alguns tipos de cânceres epiteliais como o câncer de colo uterino, porém não há uma correlação comprovada com a presença em QAs, posto que, com frequência, identifica-se o DNA viral na pele normal, assim como nas lesões. Um estudo realizado na Suécia avaliou a presença de DNA do HPV em *swabs* e em biópsias de lesões curetadas, com e sem a camada córnea, de QAs, verificando uma positividade em 83% contra apenas 11%, respectivamente, sugerindo que a positividade decorra principalmente de contaminação superficial.⁵²

No entanto, um estudo prospectivo conduzido por sete anos na Austrália observou um efeito potencializador de betapapilomavírus sobre outros fatores de risco como idade, pele clara e exposição solar e a persistência da infecção ao final do estudo associou-se a um número maior de QAs.^{53,54} Além disso, outro estudo que avaliou a carga de DNA do HPV em lesões de QA e carcinomas invasivos mostrou maior detecção nas lesões pré-malignas, do que nas avançadas, sugerindo que a persistência do HPV não é necessária para a progressão da doença, porém a infecção viral poderia ter um papel nas fases iniciais da indução da carcinogênese.⁵⁵ Zaravinos também identificou maior detecção de citomegalovírus em lesões de CBC (40%) e CEC (33%) em comparação a pele normal (0%) e QAs (8%).⁵⁶

A falta de controle celular sobre o estresse oxidativo também parece estar associado ao risco aumentado de carcinogênese. Mutações que causam hipofunção das glutathione S-transferases, as quais atuam no controle da oxidação intracelular, associaram-se a maior risco de QAs.⁵⁷

Xeroderma pigmentoso é exemplo de doença genética com aumentado risco de QAs e CECs, além de extrema fotossensibilidade, decorrente de defeito na reparação dos danos ao DNA causados pela RUV.⁵⁸

A acessibilidade da pele ao exame, a frequência da doença, as alterações morfológicas, moleculares e evolutivas das QAs permitem considerá-las como um modelo interessante de pesquisa de estratégias de prevenção de carcinogênese cutânea.^{3,59}

Fatores de Risco

A história natural das QAs depende de fatores ambientais, como a exposição à RUV, carcinógenos e radiações ionizantes; além de fatores ligados ao indivíduo, como o fototipo, idade, imunossupressão e competência para o reparo do DNA.

Ao considerarmos apenas as pessoas com fototipos de I a III, 80% apresentaram uma ou mais QAs após os 60 anos de idade, segundo estudo norte-americano.¹³ O risco relativo para QA foi 14,1 vezes maior para os pacientes de fototipos baixos, quando comparados aos de fototipos altos.⁹

Apesar de bastante prevalente, alguns indivíduos são tipicamente mais acometidos por QAs que outros, como demonstra um estudo australiano que envolveu 96 pessoas, 12% dos pacientes portadores de QAs possuíam 65% do total de lesões observadas. Este trabalho também apontou grande evanescência dessas lesões. Durante 12 meses de observação, surgiram 644 novas lesões, enquanto 526 pré-existentes regrediram espontaneamente.⁶⁰ Em outra investigação, Criscione e colaboradores verificaram, por acompanhamento fotográfico, que 55% das lesões de QA registradas não estavam mais presentes após 12 meses de seguimento.⁶¹

Atualmente, as QAs são consideradas por diversos autores, neoplasias intraepiteliais de queratinócitos, apresentando uma chance cumulativa entre 5-20% de evoluir para neoplasia invasiva, sendo que o número de lesões maximiza essa ocorrência. Por outro lado, estima-se que até 27-82% dos CECs evoluam a partir de QAs, além de que entre 82-97% dos CECs apresentam QAs contíguas.^{3,62,63}

Pelo fato de QAs originarem CECs com melhor diferenciação histológica, espera-se que tais neoplasias apresentem menor risco de metastatização. Por outro lado, esta hipótese ainda não foi comprovada a partir de estudos com metodologia adequada.³

Além dos dados epidemiológicos que demonstram a associação entre a QA e o CEC, destaquem-se o perfil muito semelhante de expressão gênica das duas doenças, as alterações histológicas superponíveis e a presença de QAs contíguas a CECs, que fortalecem a hipótese de que um possa ser precursor do outro.^{2,64,65}

O tempo de progressão para carcinoma invasivo a partir de uma lesão propensa de QA, indicado pela presença de infiltração da base, inflamação, sangramento, exulceração

ou tamanho aumentado, parece ser de aproximadamente dois anos, conforme estudo que avaliou lesões histologicamente comprovadas, sendo que essa progressão seria mais rápida e as lesões mais numerosas em pacientes imunossuprimidos.⁶⁶

Uma análise retrospectiva multivariada apontou que idosos portadores de QAs possuem um risco seis vezes maior de desenvolver tumores malignos de pele em geral, sugerindo que QAs também possam ser marcadores de um fenótipo de risco neoplásico.⁶⁷

Foram identificados diversos fatores de risco ambientais e individuais para o desenvolvimento de QAs. Um estudo alemão realizado em 2009 estabeleceu associação independente entre QAs e idade maior que 66 anos (OR=1,1), gênero masculino (OR=3,9), pele clara (OR=2,2), antecedentes pessoais de câncer de pele (OR=4,8), uso irregular de filtro solar (OR=1,81) e exposição solar ocupacional (OR=1,7).⁶⁸

Uma investigação envolvendo transplantados renais na Itália identificou a presença de QA nesta população como um risco independente para o desenvolvimento de tumores cutâneos, conjuntamente à idade na época do transplante e do tempo de imunossupressão.⁶⁹ Da mesma forma, outro estudo europeu realizado na Alemanha identificou maior risco de desenvolvimento de QA nesta população, e como descrito em outros trabalhos, os imunossuprimidos apresentaram risco muito maior de desenvolverem CECs em comparação com os CBCs (CEC/CBC = 7/1), enquanto na população em geral a relação de incidência entre CEC e CBC gira em torno de 1/4.²⁴

Novas drogas têm mostrado efeitos adversos contraditórios sobre as lesões de QA, tais como o sorafenib e outras medicações biológicas inibidoras das tirosina quinases utilizadas no tratamento de carcinomas avançados. Este medicamento parece induzir inflamação das QAs preexistentes, o surgimento de CECs e lesões tipo queratoacantomas, as quais podem regredir com a suspensão da medicação.^{70,71}

Em populações de mesmo fototipo, QAs são mais frequentes em indivíduos que vivem em regiões mais próximas da linha do Equador.¹² Verificou-se também influência da sazonalidade no diagnóstico de QA, sendo esta característica mais proeminente que em dermatoses como acne, discromias e psoríase, indicando que alterações mensais da temperatura, irradiação solar, ou grau de exposição afetariam significativamente a apresentação clínica das lesões.⁷² A altitude afeta a intensidade de UVB, ocorrendo aumento da incidência de QA em cerca de 8-10% a cada 300 metros de elevação.⁷³

Além disso, filtros solares reduzem significativamente o número de QAs em até 40%,⁵⁹ já sendo verificado o seu efeito preventivo (30%) até em pacientes imunossuprimidos pós-transplante.⁷⁴

Como as lesões ocorrem tipicamente na pele exposta cronicamente à radiação solar em pessoas com fototipos baixos, são mais prevalentes em homens nas primeiras décadas da vida adulta, quando o grau de exposição solar varia significativamente com o gênero devido às exposições profissionais, havendo uma uniformização na incidência entre os sexos com o envelhecimento desses grupos. QAs nos membros inferiores são mais comuns em mulheres devido ao hábito de vestir saia.⁷⁵

A intensidade da radiação solar, a qual os indivíduos estão expostos está diretamente relacionada à prevalência de QAs, como foi verificado na população japonesa, que apresentava três vezes mais lesões em paciente residentes em latitudes menores (25°N versus 34°N), os quais estavam expostos ao dobro da incidência de UVB na comparação referida.⁷⁶

O contato com carcinógenos ambientais é outro fator relacionado ao maior risco de câncer de pele não-melanoma. Os hidrocarbonetos estão mais relacionados ao efeito contactante, já o arsênico atuaria principalmente através da água contaminada e medicamentos alternativos. Verificou-se que a ingestão do arsênico está associado à maior incidência de lesões pré-malignas de pele e que esse efeito é potencializado por outros fatores como exposição solar, fumo e pesticidas.⁷⁷

O vitiligo está associado ao maior risco de desenvolvimento de QAs pela ausência de proteção contra RUV pela falta de melanina, além da opção terapêutica pela fototerapia prolongada.⁷⁸ Pela mesma razão, QAs e CECs foram frequentes em estudo realizado com populações albinas da África equatorial.¹³⁰

Um estudo nutricional prospectivo realizado durante cinco anos identificou um efeito preventivo sobre as QAs nas pessoas que ingeriam maiores quantidades regulares de óleo de peixe e vinho, provavelmente pelos seus efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes.⁷⁹ Dieta com baixos níveis de gordura foi também associada à resolução de QAs existentes e redução na incidência de novas lesões após 24 meses de acompanhamento de 76 pacientes com história de câncer de pele.⁸⁰ Da mesma forma, um estudo transversal realizado com 93.676 mulheres caucasianas identificou uma redução de 30% na ocorrência de cânceres de pele não melanoma em usuárias regulares de mais que seis xícaras diárias de café.⁸¹

Alguns estudos epidemiológicos realizados nas últimas décadas observaram efeito protetor do uso regular de anti-inflamatórios não-hormonais (AINHs) orais e tópicos para CECs e QAs, corroborando o efeito antineoplásico dessa classe de drogas já observado em carcinomas intestinais, por exemplo.^{37,82-85}

Diclofenaco tópico a 3% mostrou-se eficiente no tratamento e impedimento da progressão das QAs.⁸³⁻⁸⁷ Em um estudo australiano, verificou-se uma redução de até 52% no número de QAs e menor incidência de CECs com o uso regular de AINHs sistêmicos.⁸⁸

Em 2008, um estudo demonstrou também uma redução de mais de 50% na incidência de tumores de pele induzidos por RUV em ratos nus que receberam nimesulida, um inibidor seletivo da COX-2.⁸⁹ Já outra investigação verificou que um inibidor seletivo, o celecoxib, interferia no crescimento de células de melanoma, inclusive em linhagens que não expressavam COX-2.⁹⁰

Formas Clínicas

Devido à gênese das QAs relacionar-se com exposição cumulativa à RUV, as áreas mais cronicamente expostas como a face, região cervical, colo, antebraços, dorso das mãos, couro cabeludo (principalmente nos homens com alopecia androgenética) e pernas (em mulheres que usam saias), são as mais comumente acometidas.¹⁹

A maioria das lesões de QAs são pápulas de crescimento lento, com menos de um centímetro de diâmetro, secas, eritematosas, pigmentadas com telangiectasias, quase sempre cobertas por escamas aderentes, amareladas ou acastanhadas, com pouca ou nenhuma infiltração. O grau de infiltração, hiperqueratose, pigmentação e ulceração secundária podem ser bastante variáveis. As áreas circundantes podem apresentar evidências de dano actínico crônico difuso com telangiectasias, elastose, rugas, alteração da pigmentação, cicatrizes estreladas e coloração amarelada (Figuras 1 e 2).¹³

As QAs do dorso das mãos e antebraços costumam ser mais espessas e hiperqueratóticas com algumas lesões ocasionalmente tendo aspecto de cornos cutâneos, sendo que alguns desses (15,7%) são de fato CECs.^{91,92}

Tradicionalmente, atribui-se o diagnóstico de QA em bases clínicas, porém esse tema ainda não foi avaliado em estudos clínicos amplos. O valor preditivo positivo do diagnóstico clínico tem variado de 74 a 94%.^{93,94} Ressalta-se que em uma pesquisa clínica sobre o uso da terapia fotodinâmica no tratamento de QAs, envolvendo 271 lesões,

uma de cada 25 lesões classificadas clinicamente como QAs, mostrou-se CEC invasivo, ao estudo histológico.⁹⁵

Não há critérios clínicos patognomônicos para o diagnóstico de QAs, no entanto há uma concordância de 91% entre o diagnóstico clínico e histopatológico.⁹⁵ Porém alguns trabalhos utilizando microscopia de reflectância confocal *in vivo* mostraram um alto grau de correlação com o diagnóstico histológico dessas lesões, identificando alargamento e pleomorfismo nuclear, indicando o potencial do uso dessa tecnologia para a confirmação diagnóstica não invasivo das QAs na prática clínica e em ensaios clínicos.^{96,97}

Certos autores dividem a apresentação clínica das lesões em três graus: grau I, visível e levemente palpável; grau II: visível e palpável; grau III: francamente visível e hiperqueratótica.⁹⁸ Além disso, outras variantes clínicas podem incluir lesões semelhantes a líquen plano e à queilíte actínica.



Figura 1. Queratose actínica do dorso nasal.



Figura 2. Queratoses actínicas múltiplas dos antebraços de portador de vitiligo sob fototerapia. Notam-se lesões hiperqueratósicas e sinais de fotoenvelhecimento na pele circunjacente.

Não há um meio definitivo para se distinguir uma QA de CEC microinvasivo, exceto pelo exame histológico. Os parâmetros clínicos que indicariam as lesões com um risco aumentado de malignidade seriam infiltração, inflamação, diâmetro maior que 1 cm, crescimento rápido, sangramento, eritema e ulceração.⁹⁹

QAs que se desenvolvem em mucosas, em especial a queilite actínica, originam CECs com maior potencial de metástase, porém, ultrapassam o escopo deste texto.^{100,101}

Apesar de QA ser considerada uma dermatose de baixa morbidade, verificou-se significativo comprometimento na qualidade de vida (Skindex-29) dos afetados, o qual parece ser proporcional à quantidade de lesões apresentadas.¹⁰²

Embora sejam bastante características, as lesões de QAs podem ser confundidas clinicamente com queratoses seborreicas, doença de Bowen, CEC, carcinoma basocelular, lúpus eritematoso discoide, estucoqueratose, lentigo solar, poroqueratose e verrugas virais.

Histopatologia

O diagnóstico clínico de QA é confirmado pelo exame histopatológico da lesão. Histologicamente, QA se caracteriza pela perda da maturação ordenada com queratinócitos atípicos na epiderme e aumento no número de mitoses. Os queratinócitos

revelam uma perda de polarização e células atípicas apresentando núcleos pleomórficos, de tamanho aumentado e hipercromáticos, e citoplasma eosinofílico, pálido ou vacuolizado.^{15,103} Esta alteração nuclear parece seguir uma progressão contínua correlacionada com o grau de dano solar sofrido.¹⁰⁴

Tipicamente, a epiderme interanexial está comprometida poupando a epiderme dos folículos pilosos e ductos écrinos. Isto resulta em um aspecto de faixas verticais consecutivas de hiperqueratose e paraqueratose, correspondendo à epiderme dos anexos sã e epiderme interanexial doente. A proteção do dano epidérmico dada pelo folículo piloso é retratada por alguns patologistas como “fenômeno do guarda-chuva”.^{103,105}

A derme geralmente apresenta elastose solar e infiltrado linfocitário perivascular ou liquenoide de intensidade variável.¹⁵

Bartels verificou que a cariometria de queratinócitos provenientes de pele considerada normal na histologia se mostra alterada em proporção ao nível de fotoexposição, indicando haver uma possível evolução pré-clínica das QAs acometendo mais extensamente as áreas afetadas.¹⁰⁶

Citologicamente, os achados das QAs são indistinguíveis dos CECs.¹⁰³

Ao exame histopatológico, QAs podem ser divididas em seis tipos: hipertrófico, atrófico, bowenoide, acantolítico, liquenoide e pigmentado.¹⁰⁷

O tipo hipertrófico apresenta hiperparaqueratose pronunciada, espessamento da epiderme em algumas áreas com crescimento irregular de projeções proliferativas limitadas à parte superior da derme, sem invasão evidente. No tipo atrófico há uma leve hiperqueratose e uma atrofia epidérmica difusa com células atípicas na camada basal. O tipo bowenoide apresenta atipia em toda a espessura da epiderme, semelhante à doença de Bowen, sendo diferenciado desta por não acometer o epitélio da bainha folicular. O tipo acantolítico apresenta fendas e lacunas intercelulares decorrentes de alterações anaplásicas dos queratinócitos. No tipo liquenoide há um infiltrado em faixa na zona da membrana basal, e, no tipo pigmentado, ocorre um excesso de melanina especialmente nas células basais e uma maior concentração de melanófagos na derme. Por fim, deve-se ressaltar que essas características podem se sobrepor, sendo o tipo histológico definido pela característica mais proeminente.^{13,15}

Um diferente esquema de classificação das QAs foi desenvolvido levando em consideração o grau de atipia presente na epiderme. Semelhante ao padrão utilizado na avaliação das lesões pré-malignas de colo de útero, as lesões são divididas em três graus de neoplasia intraqueratinocítica (NIQ): grau I, com atipia restrita a camada basal e

suprabasal; grau II, com atipia estendendo-se até dois terços inferiores da epiderme; grau III, com atipia em toda a espessura da epiderme.^{32,108}

Quadro 1. Critérios para a classificação NIQ.³²

Grau	Definição
I	Hiperchromia dos núcleos da camada basal e suprabasal; Variabilidade no tamanho dos queratinócitos; Variabilidade na perda de polarização nuclear dos queratinócitos; Ausência de hiperqueratose ou paraqueratose; Ausência de acometimento de anexos.
II	Proliferação atípica de queratinócitos nos 2/3 inferiores da epiderme; Aumento do índice mitótico; Nucléolos proeminentes; Irregularidade dos contornos dos queratinócitos; Alternância de ortoqueratose e paraqueratose; Acantólise; Aumento da pigmentação da camada basal.
III	Proliferação atípica de queratinócitos em todo epitélio; Extensão das atipias para os folículos; Perda da camada granulosa; Presença de paraqueratose; Doença de Bowen.

Alguns autores acreditam que esta abordagem na descrição histológica promoveria medidas terapêuticas concordantes com o risco de evolução maligna de cada lesão ou paciente.¹⁵

Finalmente, alguns autores defendem que QA seja considerada um CEC *in situ*, devido à possível evolução para neoplasia invasiva, alterações microscópicas e marcadores genéticos semelhantes entre as doenças, porém, há diferenças suficientes clínicas, epidemiológicas, moleculares e de história natural que garantem a individualidade dos diagnósticos.^{103,109-114}

Considerações Finais

Indivíduos de pele clara, submetidos à exposição solar crônica compõem significativa proporção da população brasileira e devem ser identificados como de risco para QAs e neoplasias cutâneas.¹¹⁵

Políticas de fotoproteção, fotoeducação e diagnóstico precoce em profissionais expostos à radiação solar devem ser promovidas pelas sociedades médicas e sindicatos como estratégias de prevenção de agravos ocupacionais.

Além de que QAs retratarem a agressão solar cumulativa, sejam precursoras de CECs, e se desenvolvam em áreas acessíveis para avaliação clínica e laboratorial, prestam-se ao estudo de carcinogênese humana, assim como favorecem-se ensaios clínicos terapêuticos e preventivos.

Há diversas modalidades terapêuticas eficientes para as QAs. Citem-se técnicas destrutivas diretas como a crioterapia, uso de ácido tricloroacético, laserterapia, eletrocoagulação, dermabrasão, *shaving* e excisão com sutura primária. Estratégias não cirúrgicas apresentam a vantagem de tratar áreas mais amplas com o potencial de agir sobre o campo de cancerização, citem-se: terapia fotodinâmica, imiquimod 3,75 a 5%, 5-fluorouracil 0,5 a 5%, diclofenaco 3%, tretinoína tópica 0,1%, masoprocol 10% e colchicina 0,5 a 1%. Peelings médios, *ressurfacing* a laser e dermoabrasão do epitélio são também descritos no tratamento de lesões múltiplas. A maioria das abordagens oferece cura completa de mais de 30% dos pacientes em cada sessão, usualmente, necessitando sessões suplementares para lesões remanescentes. QAs infiltradas ou hiperqueratósicas são mais resistentes à terapêutica. A análise pormenorizada dos tratamentos foge ao escopo deste texto. Há, porém, significativa discussão sobre custo-efetividade de terapêuticas que tratem não somente as lesões, mas de todo o campo de cancerização.^{81,116-124}

O diagnóstico de QA deve desencadear para os pacientes, além do tratamento, orientações quanto à fotoexposição ocupacional e no lazer, esclarecimento quanto aos horários de risco, vestuário, uso regular de fotoprotetores (FPS \geq 15) e autoexame periódico da pele.^{3,29,75}

Como o epitélio perilesional apresenta alterações decorrentes da fotoexposição, o entendimento da existência de um “campo de cancerização” deve ser promovido para os pacientes, reforçando a importância do seguimento clínico preventivo.

Pacientes com QAs devem ser entendidos como de risco para outras neoplasias cutâneas e devem ser seguidos clinicamente não só para o tratamento das QAs, mas para diagnóstico precoce de outras dermatoses, entre eles carcinomas e melanoma.^{125,126}

Campanhas de prevenção do câncer de pele devem incentivar a educação médica e da população para o diagnóstico de QAs a fim de aumentar a percepção do paciente e dos médicos para alterações significativas da pele, o que, indiretamente, aumentaria o

número de diagnósticos dermatológicos da população, reduzindo a morbidade de doenças que ocorrem pelo atraso diagnóstico. Secundariamente, isso valorizaria a especialidade perante a sociedade.^{127,128}

Enfim, o seguimento periódico de pacientes com QA deve ser entendido como uma oportunidade de reexaminar os pacientes, promover saúde da pele e incentivar medidas de fotoproteção.

Referências

1. Goldberg LH, Mamelak AJ. Review of actinic keratosis. Part I: etiology, epidemiology and clinical presentation. *J Drugs Dermatol* 2010;9:1125-32.
2. Babilas P, Landthaler M, Szeimies RM. Actinic keratoses. *Hautarzt* 2003;54:551-60.
3. Castro IA, Schütz LC, Capp E, Bakos L. Ceratoses actínicas. *Rev HCPA* 2006;26:66-72.
4. Anwar J, Wrone DA, Kimyai-Asadi A, Alam M. The development of actinic keratosis into invasive squamous cell carcinoma: evidence and evolving classification schemes. *Clin Dermatol* 2004;22:189-96.
5. Lanssens S, Ongenaes K. Dermatologic lesions and risk for cancer. *Acta Clin Belg* 2011;66:177-85.
6. Glogau RG. Aesthetic and anatomic analysis of the aging skin. In; 1996: Elsevier; 1996. p. 134-8.
7. Chia A, Moreno G, Lim A, Shumack S. Actinic keratoses. *Aust Fam Physician* 2007;36: 539-43.
8. Feldman SR, Fleischer AB, Jr., McConnell RC. Most common dermatologic problems identified by internists, 1990-1994. *Arch Intern Med* 1998;158: 726-30.
9. Lebwohl M. Actinic keratosis: epidemiology and progression to squamous cell carcinoma. *Br J Dermatol* 2003;149 Suppl 66:31-3.
10. Sociedade Brasileira de Dermatologia SBD. Perfil nosológico das consultas dermatológicas no Brasil. *An Bras Dermatol* 2006;81:549-58.
11. Bernard P, Dupuy A, Sasco A, et al. Basal cell carcinomas and actinic keratoses seen in dermatological practice in France: a cross-sectional survey. *Dermatology* 2008;216:194-9.
12. Frost CA, Green AC. Epidemiology of solar keratoses. *Br J Dermatol* 1994;131:455-64.
13. Rossi R, Mori M, Lotti T. Actinic keratosis. *Int J Dermatol* 2007;46:895-904.
14. Vatve M, Ortonne JP, Birch-Machin MA, Gupta G. Management of field change in actinic keratosis. *Br J Dermatol* 2007;157 Suppl 2:21-4.
15. Roewert-Huber J, Stockfleth E, Kerl H. Pathology and pathobiology of actinic (solar) keratosis - an update. *Br J Dermatol* 2007;157 Suppl 2:18-20.
16. Ishioka P, Marques SA, Hirai AT, Marques ME, Hirata SH, Yamada S. Prevalence of precancerous skin lesions and non-melanoma skin cancer in Japanese-Brazilians in Bauru, São Paulo State, Brazil. *Cad Saude Publica* 2009;25:965-71.
17. Kim HS, Cho EA, Bae JM, et al. Recent trend in the incidence of premalignant and malignant skin lesions in Korea between 1991 and 2006. *J Korean Med Sci* 2010;25:924-9.
18. Kennedy C, Bajdik CD, Willemze R, De Gruijl FR, Bouwes Bavinck JN. The influence of painful sunburns and lifetime sun exposure on the risk of actinic keratoses, seborrheic warts, melanocytic nevi, atypical nevi, and skin cancer. *J Invest Dermatol* 2003;120:1087-93.
19. Salasche SJ. Epidemiology of actinic keratoses and squamous cell carcinoma. *J Am Acad Dermatol* 2000;42:4-7.
20. Garg S, Carroll RP, Walker RG, Ramsay HM, Harden PN. Skin cancer surveillance in renal transplant recipients: re-evaluation of U.K. practice and comparison with Australian experience. *Br J Dermatol* 2009;160:177-9.
21. Ulrich C, Kanitakis J, Stockfleth E, Euvrard S. Skin cancer in organ transplant recipients--where do we stand today? *Am J Transplant* 2008;8:2192-8.
22. Dornelas MT, Rodrigues MF, Machado DC, Gollner A, 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.
23. Chinem VP, Miot HA. Epidemiology of basal cell carcinoma. *An Bras Dermatol* 2011;86:292-305.
24. Keller B, Braathen LR, Marti HP, Hunger RE. Skin cancers in renal transplant recipients: a description of the renal transplant cohort in Bern. *Swiss Med Wkly* 2010;140:w13036.
25. Leffell DJ. The scientific basis of skin cancer. *J Am Acad Dermatol* 2000;42:18-22.
26. Berking C. [The role of ultraviolet irradiation in malignant melanoma]. *Hautarzt* 2005;56:687-96.

27. Arrington JH, 3rd, Lockman DS. Thermal keratoses and squamous cell carcinoma in situ associated with erythema ab igne. *Arch Dermatol* 1979;115:1226-8.
28. Eskelinen A, Halme K, Lassus A, Idanpaan-Heikkila J. Risk of cutaneous carcinoma in psoriatic patients treated with PUVA. *Photodermatol* 1985;2:10-4.
29. Balogh TS, Velasco MVR, Pedriali CA, Kaneko TM, Baby AR. Proteção à radiação ultravioleta: recursos disponíveis na atualidade em fotoproteção. *An Bras Dermatol* 2011;86:732-42.
30. Lever LR, Farr PM. Skin cancers or premalignant lesions occur in half of high-dose PUVA patients. *Br J Dermatol* 1994;131:215-9.
31. Nindl I, Gottschling M, Krawtchenko N, et al. Low prevalence of p53, p16(INK4a) and Ha-ras tumour-specific mutations in low-graded actinic keratosis. *Br J Dermatol* 2007;156 Suppl 3:34-9.
32. Wang HJ, Liu XJ, Yang KX, Luo FM, Lou JY, Peng ZL. Effects of nonsteroidal anti-inflammatory drug celecoxib on expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) in ovarian carcinoma cell. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 2006; 37: 757-60.
33. Muller-Decker K, Charyalertsak S, Albert C, Reinerth G, Marks F, Furstenberger G. Cyclooxygenase-2: a molecular target for chemoprevention of epithelial tumors of skin and colon. *Adv Exp Med Biol* 2002;507:445-8.
34. Muller-Decker K, Neufang G, Berger I, Neumann M, Marks F, Furstenberger G. Transgenic cyclooxygenase-2 overexpression sensitizes mouse skin for carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 12483-8.
35. Tiano HF, Loftin CD, Akunda J, et al. Deficiency of either cyclooxygenase (COX)-1 or COX-2 alters epidermal differentiation and reduces mouse skin tumorigenesis. *Cancer Res* 2002; 62: 3395-401.
36. Berhane T, Halliday GM, Cooke B, Barnetson RS. Inflammation is associated with progression of actinic keratoses to squamous cell carcinomas in humans. *Br J Dermatol* 2002; 146: 810-5.
37. Fecker LF, Stockfleth E, Nindl I, Ulrich C, Forschner T, Eberle J. The role of apoptosis in therapy and prophylaxis of epithelial tumours by nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). *Br J Dermatol* 2007; 156 Suppl 3: 25-33.
38. Tjiu JW, Liao YH, Lin SJ, et al. Cyclooxygenase-2 overexpression in human basal cell carcinoma cell line increases antiapoptosis, angiogenesis, and tumorigenesis. *J Invest Dermatol* 2006;126:1143-51.
39. Nijsten T, Colpaert CG, Vermeulen PB, Harris AL, Van Marck E, Lambert J. Cyclooxygenase-2 expression and angiogenesis in squamous cell carcinoma of the skin and its precursors: a paired immunohistochemical study of 35 cases. *Br J Dermatol* 2004; 151: 837-45.
40. Wu Y, Liu H, Li J. Expression of p63 and cyclooxygenase-2 and their correlation in skin tumors. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2007; 27: 206-8.
41. Ouyang W, Zhang D, Ma Q, Li J, Huang C. Cyclooxygenase-2 induction by arsenite through the IKKbeta/NFkappaB pathway exerts an antiapoptotic effect in mouse epidermal CI41 cells. *Environ Health Perspect* 2007; 115: 513-8.
42. 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.
43. Park HR, Min SK, Cho HD, Kim KH, Shin HS, Park YE. Expression profiles of p63, p53, survivin, and hTERT in skin tumors. *J Cutan Pathol* 2004; 31: 544-9.
44. Bortoluzzi MC, Yurgel LS, Dekker NP, Jordan RC, Regezi JA. Assessment of p63 expression in oral squamous cell carcinomas and dysplasias. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004; 98: 698-704.
45. Nylander K, Vojtesek B, Nenutil R, et al. Differential expression of p63 isoforms in normal tissues and neoplastic cells. *J Pathol* 2002; 198: 417-27.
46. Parsa R, Yang A, McKeon F, Green H. Association of p63 with proliferative potential in normal and neoplastic human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 1999; 113: 1099-105.
47. Salama ME, Mahmood MN, Qureshi HS, Ma C, Zarbo RJ, Ormsby AH. p16INK4a expression in actinic keratosis and Bowen's disease. *Br J Dermatol* 2003;149:1006-12.
48. Toll A, Salgado R, Yebenes M, et al. Epidermal growth factor receptor gene numerical aberrations are frequent events in actinic keratoses and invasive cutaneous squamous cell carcinomas. *Exp Dermatol* 2010;19:151-3.
49. Toll A, Salgado R, Yebenes M, et al. MYC gene numerical aberrations in actinic keratosis and cutaneous squamous cell carcinoma. *Br J Dermatol* 2009;161:1112-8.
50. Takahara M, Chen S, Kido M, et al. Stromal CD10 expression, as well as increased dermal macrophages and decreased Langerhans cells, are associated with malignant transformation of keratinocytes. *J Cutan Pathol* 2009;36:668-74.
51. Jang TJ. Prevalence of Foxp3 positive T regulatory cells is increased during progression of cutaneous squamous tumors. *Yonsei Med J* 2008;49:942-8.

52. Forslund O, Lindelof B, Hradil E, et al. High prevalence of cutaneous human papillomavirus DNA on the top of skin tumors but not in "Stripped" biopsies from the same tumors. *J Invest Dermatol* 2004;123:388-94.
53. McBride P, Neale R, Pandeya N, Green A. Sun-related factors, betapapillomavirus, and actinic keratoses: a prospective study. *Arch Dermatol* 2007;143:862-8.
54. Plasmeijer EI, Neale RE, de Koning MN, et al. Persistence of betapapillomavirus infections as a risk factor for actinic keratoses, precursor to cutaneous squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 2009;69:8926-31.
55. Weissenborn SJ, Nindl I, Purdie K, et al. Human papillomavirus-DNA loads in actinic keratoses exceed those in non-melanoma skin cancers. *J Invest Dermatol* 2005;125:93-7.
56. Zaravinos A, Kanellou P, Spandidos DA. Viral DNA detection and RAS mutations in actinic keratosis and nonmelanoma skin cancers. *Br J Dermatol* 2010;162:325-31.
57. Guarneri F, Asmundo A, Sapienza D, Gazzola A, Cannavo SP. Polymorphism of glutathione S-transferases M1 and T1: susceptibility to solar keratoses in an Italian population. *Clin Exp Dermatol* 2010;35:771-5.
58. Cleaver JE. Cancer in xeroderma pigmentosum and related disorders of DNA repair. *Nat Rev Cancer* 2005;5:564-73.
59. Thompson SC, Jolley D, Marks R. Reduction of solar keratoses by regular sunscreen use. *N Engl J Med* 1993;329:1147-51.
60. Frost C, Williams G, Green A. High incidence and regression rates of solar keratoses in a queensland community. *J Invest Dermatol* 2000;115:273-7.
61. Criscione VD, Weinstock MA, Naylor MF, Luque C, Eide MJ, Bingham SF. Actinic keratoses: Natural history and risk of malignant transformation in the Veterans Affairs Topical Tretinoin Chemoprevention Trial. *Cancer* 2009;115:2523-30.
62. Mittelbronn MA, Mullins DL, Ramos-Caro FA, Flowers FP. Frequency of pre-existing actinic keratosis in cutaneous squamous cell carcinoma. *Int J Dermatol* 1998;37:677-81.
63. Marks VJ. Actinic keratosis. A premalignant skin lesion. *Otolaryngol Clin North Am* 1993;26:23-35.
64. Padilla RS, Sebastian S, Jiang Z, Nindl I, Larson R. Gene expression patterns of normal human skin, actinic keratosis, and squamous cell carcinoma: a spectrum of disease progression. *Arch Dermatol* 2010;146:288-93.
65. Schwarze HP, Loche F, Gorguet MC, Kuchta J, Bazex J. Invasive cutaneous squamous cell carcinoma associated with actinic keratosis: a case with orbital invasion and meningeal infiltration. *Dermatol Surg* 1999;25:587-9.
66. Fuchs A, Marmur E. The kinetics of skin cancer: progression of actinic keratosis to squamous cell carcinoma. *Dermatol Surg* 2007;33:1099-101.
67. Chen GJ, Feldman SR, Williford PM, et al. Clinical diagnosis of actinic keratosis identifies an elderly population at high risk of developing skin cancer. *Dermatol Surg* 2005;31:43-7.
68. Hensen P, Muller ML, Haschemi R, et al. Predisposing factors of actinic keratosis in a North-West German population. *Eur J Dermatol* 2009;19:345-54.
69. Savoia P, Stroppiana E, Cavaliere G, et al. Skin cancers and other cutaneous diseases in renal transplant recipients: a single Italian center observational study. *Eur J Dermatol* 2011;21:242-7.
70. Dubauskas Z, Kunishige J, Prieto VG, Jonasch E, Hwu P, Tannir NM. Cutaneous squamous cell carcinoma and inflammation of actinic keratoses associated with sorafenib. *Clin Genitourin Cancer* 2009;7:20-3.
71. Schmid-Wendtner MH, Wendtner CM. Intensified inflammatory reaction of actinic keratoses after single application of topical 5-fluorouracil in a patient treated with nilotinib for chronic myeloid leukemia. *Dermatology* 2009;219:341-3.
72. Hancox JG, Sheridan SC, Feldman SR, Fleischer AB, Jr. Seasonal variation of dermatologic disease in the USA: a study of office visits from 1990 to 1998. *Int J Dermatol* 2004;43:6-11.
73. Rigel DS, Rigel EG, Rigel AC. Effects of altitude and latitude on ambient UVB radiation. *J Am Acad Dermatol* 1999;40:114-6.
74. Ulrich C, Jurgensen JS, Degen A, et al. Prevention of non-melanoma skin cancer in organ transplant patients by regular use of a sunscreen: a 24 months, prospective, case-control study. *Br J Dermatol* 2009;161 Suppl 3:78-84.
75. Vitasa BC, Taylor HR, Strickland PT, et al. Association of nonmelanoma skin cancer and actinic keratosis with cumulative solar ultraviolet exposure in Maryland watermen. *Cancer* 1990;65:2811-7.
76. Araki K, Nagano T, Ueda M, et al. Incidence of skin cancers and precancerous lesions in Japanese--risk factors and prevention. *J Epidemiol* 1999;9:S14-21.
77. Melkonian S, Argos M, Pierce BL, et al. A prospective study of the synergistic effects of arsenic exposure and smoking, sun exposure, fertilizer use, and pesticide use on risk of premalignant skin lesions in Bangladeshi men. *Am J Epidemiol* 2011;173:183-91.

78. Akimoto S, Suzuki Y, Ishikawa O. Multiple actinic keratoses and squamous cell carcinomas on the sun-exposed areas of widespread vitiligo. *Br J Dermatol* 2000;142:824-5.
79. Hughes MC, Williams GM, Fourtanier A, Green AC. Food intake, dietary patterns, and actinic keratoses of the skin: a longitudinal study. *Am J Clin Nutr* 2009;89:1246-55.
80. Black HS, Herd JA, Goldberg LH, et al. Effect of a low-fat diet on the incidence of actinic keratosis. *N Engl J Med* 1994;330:1272-5.
81. Abel EL, Hendrix SO, McNeeley SG, et al. Daily coffee consumption and prevalence of nonmelanoma skin cancer in Caucasian women. *Eur J Cancer Prev* 2007;16:446-52.
82. Grau de Castro JJ. COX-2 inhibitors in cancer prevention. *Rev Clin Esp* 2005;205:446-56.
83. Ulrich C, Johannsen A, Rowert-Huber J, Ulrich M, Sterry W, Stockfleth E. Results of a randomized, placebo-controlled safety and efficacy study of topical diclofenac 3% gel in organ transplant patients with multiple actinic keratoses. *Eur J Dermatol* 2010;20:482-8.
84. Dirschka T, Bierhoff E, Pflugfelder A, Garbe C. Topical 3.0% diclofenac in 2.5% hyaluronic acid gel induces regression of cancerous transformation in actinic keratoses. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2010;24:258-63.
85. Kose O, Koc E, Erbil AH, Caliskan E, Kurumlu Z. Comparison of the efficacy and tolerability of 3% diclofenac sodium gel and 5% imiquimod cream in the treatment of actinic keratosis. *J Dermatolog Treat* 2008;19:159-63.
86. Nelson C, Rigel D. Long-term Follow up of Diclofenac Sodium 3% in 2.5% Hyaluronic Acid Gel for Actinic Keratosis: One-year Evaluation. *J Clin Aesthet Dermatol* 2009;2:20-5.
87. Fariba I, Ali A, Hossein SA, Atefeh S, Atarzadeh Behbahan SA. Efficacy of 3% diclofenac gel for the treatment of actinic keratoses: a randomized, double-blind, placebo controlled study. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 2006;72:346-9.
88. Butler GJ, Neale R, Green AC, Pandeya N, Whiteman DC. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and the risk of actinic keratoses and squamous cell cancers of the skin. *J Am Acad Dermatol* 2005;53:966-72.
89. Tang X, Kim AL, Kopelovich L, Bickers DR, Athar M. Cyclooxygenase-2 inhibitor nimesulide blocks ultraviolet B-induced photocarcinogenesis in SKH-1 hairless mice. *Photochem Photobiol* 2008;84:522-7.
90. Bundscherer A, Hafner C, Maisch T, Becker B, Landthaler M, Vogt T. Antiproliferative and proapoptotic effects of rapamycin and celecoxib in malignant melanoma cell lines. *Oncol Rep* 2008;19:547-53.
91. Yu RC, Pryce DW, Macfarlane AW, Stewart TW. A histopathological study of 643 cutaneous horns. *Br J Dermatol* 1991;124:449-52.
92. Dergham AP, Muraro CC, Ramos EA, Mesquita LAF, Collaço LM. Distribution of diagnosis of neoplastic and preneoplastic skin lesions at Evangelical Hospital in Curitiba. *An Bras Dermatol* 2004;79:555-9.
93. Venna SS, Lee D, Stadecker MJ, Rogers GS. Clinical recognition of actinic keratoses in a high-risk population: how good are we? *Arch Dermatol* 2005;141:507-9.
94. Epstein E. Quantifying actinic keratosis: assessing the evidence. *Am J Clin Dermatol* 2004;5:141-4.
95. Ehrig T, Cockerell C, Piacquadio D, Dromgoole S. Actinic keratoses and the incidence of occult squamous cell carcinoma: a clinical-histopathologic correlation. *Dermatol Surg* 2006;32:1261-5.
96. Ulrich M, Forschner T, Rowert-Huber J, et al. Differentiation between actinic keratoses and disseminated superficial actinic porokeratoses with reflectance confocal microscopy. *Br J Dermatol* 2007;156 Suppl 3:47-52.
97. Mogensen M, Jemec GB. Diagnosis of nonmelanoma skin cancer/keratinocyte carcinoma: a review of diagnostic accuracy of nonmelanoma skin cancer diagnostic tests and technologies. *Dermatol Surg* 2007;33:1158-74.
98. Butani AK, Arbesfeld DM, Schwartz RA. Premalignant and early squamous cell carcinoma. *Clin Plast Surg* 2005;32:223-35.
99. Quaedvlieg PJ, Ostertag JU, Krekels GA, Neumann HA. Delayed wound healing after three different treatments for widespread actinic keratosis on the atrophic bald scalp. *Dermatol Surg* 2003;29:1052-6.
100. Wood NH, Khammissa R, Meyerov R, Lemmer J, Feller L. Actinic cheilitis: a case report and a review of the literature. *Eur J Dent* 2011;5:101-6.
101. Rossoe EWT, Tebcherani AJ, Sittart JA, Pires MC. Queilite actínica: avaliação comparativa estética e funcional entre as vermelhectomias clássica e em W-plastia. *An Bras Dermatol* 2011;86:65-73.
102. Lee K, Weinstock M. Prospective quality of life impact of actinic keratoses: observations from the veterans affairs topical tretinoin chemoprevention trial. *Acta Derm Venereol* 2011;91:101-2.
103. Cockerell CJ. Pathology and pathobiology of the actinic (solar) keratosis. *Br J Dermatol* 2003;149 Suppl 66:34-6.
104. Krouse RS, Alberts DS, Prasad AR, et al. Progression of skin lesions from normal skin to squamous cell carcinoma. *Anal Quant Cytol Histol* 2009; 31:17-25.

105. Roewert-Huber J, Lange-Asschenfeldt B, Stockfleth E, Kerl H. Epidemiology and aetiology of basal cell carcinoma. *Br J Dermatol* 2007;157 Suppl 2:47-51.
106. Bartels PH, Krouse RS, Prasad AR, et al. Actinic damage in histopathologically normal skin. *Anal Quant Cytol Histol* 2008;30:316-22.
107. James C, Crawford RI, Martinka M, Marks R. Actinic keratosis. In: James C, Crawford RI, Martinka M, Marks R, eds. *WHO Pathology & Genetics, Skin tumors*. Lyon: IARC Press; 2006:30-3.
108. Yantsos VA, Conrad N, Zabawski E, Cockerell CJ. Incipient intraepidermal cutaneous squamous cell carcinoma: a proposal for reclassifying and grading solar (actinic) keratoses. *Semin Cutan Med Surg* 1999;18:3-14.
109. Rowert-Huber J, Patel MJ, Forschner T, et al. Actinic keratosis is an early in situ squamous cell carcinoma: a proposal for reclassification. *Br J Dermatol* 2007;156 Suppl 3:8-12.
110. Lober BA, Lober CW, Accola J. Actinic keratosis is squamous cell carcinoma. *J Am Acad Dermatol* 2000;43:881-2.
111. Person JR. An actinic keratosis is neither malignant nor premalignant: it is an initiated tumor. *J Am Acad Dermatol* 2003;48:637-8.
112. Ko CJ. Actinic keratosis: facts and controversies. *Clin Dermatol* 2010;28:249-53.
113. Petit A. [Actinic keratoses are still actinic keratoses]. *Ann Dermatol Venereol* 2008;135:93-6.
114. Deltondo JA, Helm KF. Actinic keratosis: precancer, squamous cell carcinoma, or marker of field cancerization? *G Ital Dermatol Venereol* 2009;144:441-4.
115. Rocha FP, Menezes AMB, Almeida Jr. HL, Tomasi E. Marcadores e fatores de risco para queratoses actínicas e carcinomas basocelulares: um estudo de caso-controle. *An Bras Dermatol* 2004;79:441-54.
116. de Berker D, McGregor JM, Hughes BR. Guidelines for the management of actinic keratoses. *Br J Dermatol* 2007;156:222-30.
117. Rossi R, Calzavara-Pinton PG, Giannetti A, et al. Italian guidelines and therapeutic algorithm for actinic keratoses. *G Ital Dermatol Venereol* 2009;144:713-23.
118. Del Rosso JQ. Current regimens and guideline implications for the treatment of actinic keratosis: proceedings of a clinical roundtable at the 2011 Winter Clinical Dermatology Conference. *Cutis* 2011;88:suppl 1-8.
119. Borgonjen RJ, van Everdingen JJ, Bik CM, Tuut MK, Spuls PI, van de Kerkhof PC. Prospective comparison of three guideline development methods for treatment of actinic keratosis. *BMJ Qual Saf* 2011 20: 832-41.
120. Muston D, Downs A, Rives V. An economic evaluation of topical treatments for actinic keratosis. *J Dermatolog Treat* 2009;20:266-75.
121. Gold MH. Pharmacoeconomic analysis of the treatment of multiple actinic keratoses. *J Drugs Dermatol* 2008;7:23-5.
122. Deonizio JMD, Mulinari-Brenner FA. Cryopeeling for treatment of photodamage and actinic keratosis: liquid nitrogen versus portable system. *An Bras Dermatol* 2011;86:440-4.
123. Ritter CG, Kuhl ICP, Lenhardt C, Weissbluth ML, Bakos RM. Terapêutica fotodinâmica com ácido delta-aminolevulínico e luz de diodos em ceratoses actínicas. *An Bras Dermatol* 2010;85:639-45.
124. Poziomczyk CS, Köche B, Dornelles MA, Dornelles SIT. Avaliação da dor em criocirurgia de ceratoses actínicas. *An Bras Dermatol* 2011;86:645-50.
125. Fenske NA, Spencer J, Adam F. Actinic keratoses: past, present and future. *J Drugs Dermatol* 2010;9:s45-9.
126. Strickland PT, Vitasa BC, West SK, Rosenthal FS, Emmett EA, Taylor HR. Quantitative carcinogenesis in man: solar ultraviolet B dose dependence of skin cancer in Maryland watermen. *J Natl Cancer Inst* 1989;81:1910-3.
127. Sociedade Brasileira de Dermatologia SBD. Análise de dados das campanhas de prevenção ao câncer da pele promovidas pela Sociedade Brasileira de Dermatologia de 1999 a 2005. *An Bras Dermatol* 2006;81:533-9.
128. Feldman SR, Fleischer AB, Jr. Skin examinations and skin cancer prevention counseling by US physicians: a long way to go. *J Am Acad Dermatol* 2000;43:234-7.
129. Chuang TY, Brashear R. Risk factors of non-melanoma skin cancer in United States veterans patients: a pilot study and review of literature. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 1999; 12:126-32.
130. Lookingbill DP, Lookingbill GL, Leppard B. Actinic damage and skin cancer in albinos in northern Tanzania: findings in 164 patients enrolled in an outreach skin care program. *J Am Acad Dermatol*. 1995; 32: 653-8.

3. Objetivos

3.1. Objetivos gerais

1. Avaliar a expressão de fatores ligados a vias de apoptose, inflamação e proliferação celular em queratoses actínicas, pele fotoexposta e pele fotoprottegida.
2. Avaliar a prevalência de queratoses actínicas em pacientes com mais de 50 anos de idade e a influência da exposição regular ao ácido acetilsalicílico.
3. Avaliar os fatores de risco ambientais, comportamentais, aspectos de fotoproteção, características fenotípicas e familiares relacionados ao desenvolvimento de queratoses actínicas.

3.2. Objetivos específicos

1. Descrever e comparar a expressão de fatores ligados a diferentes vias de apoptose e inflamação (p53, p105/p50, survivina e COX-2), além de proliferação celular (Ki-67) em queratoses actínicas, epiderme fotoexposta e epiderme fotoprottegida.
2. Correlacionar a expressão de proteínas das vias apoptóticas, inflamatórias e de proliferação celular com o grau de displasia (NIQ) das lesões.

4. Segundo manuscrito

Título: Expressão de fatores antiapoptóticos, de proliferação e de inflamação em queratoses actínicas.

Title: *Expression of antiapoptotic, proliferative and inflammation factors in actinic keratosis.*

Autores:

Juliano Vilaverde Schmitt (1) – julivs@gmail.com

Mariângela Esther Alencar Marques (2) – mmarques@fmb.unesp.br

Hélio Amante Miot (1) – heliomiot@fmb.unesp.br

1. Departamento de Dermatologia e Radioterapia da Faculdade de Medicina de Botucatu, Unesp, Campus de Rubião Jr, Botucatu, SP, Brasil.
2. Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, Unesp, Campus de Rubião Jr, Botucatu, SP, Brasil.

Instituição onde o trabalho foi desenvolvido:

Departamentos de Dermatologia e Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, Unesp, Campus de Rubião Jr, Botucatu, SP, Brasil.

Autor correspondente:

Juliano Vilaverde Schmitt

Rua Estados Unidos, 1454 / 1202, Bairro Bacacheri, Curitiba-PR

CEP: 82510-050

E-mail: julivs@gmail.com

Resumo

Fundamentos: Queratoses actínicas são proliferações de queratinócitos atípicos, que podem evoluir como neoplasia invasiva. A investigação de vias inflamatórias, de apoptose, e proliferação celular pode contribuir no entendimento da carcinogênese cutânea em humanos.

Objetivos: Avaliar a expressão de marcadores de proliferação, resistência à apoptose e inflamação nas lesões de queratoses actínicas, pele normal fotoexposta e fotoprottegida.

Métodos: Estudo transversal envolvendo portadores de queratoses actínicas dos antebraços. Obtiveram-se fragmentos de pele que incluíam lesões de queratoses actínicas e pele fotoexposta perilesional, e fragmento de pele fotoprottegida axilar. As amostras foram submetidas à marcação imuno-histoquímica para p53, survivina, Ki-67, p105/p50 e COX-2. Marcações nucleares foram mensuradas pelo HSCORE e as citoplasmáticas pela fração de campos marcados. As lesões foram graduadas quanto ao grau de atipia pela classificação de neoplasia intraepitelial queratinocítica (NIQ).

Resultados: Foram avaliadas 38 queratoses actínicas em 13 pacientes, cuja idade variou de 37 a 88 anos, havendo oito lesões de NIQ I, 21 lesões de NIQ II e nove lesões de NIQ III. Os marcadores Ki-67, p53, survivina e COX-2 foram menos expressos na pele normal fotoprottegida em comparação com as lesões de QAs ($p < 0,05$). A marcação nuclear para p105/p50 foi mais intensa na pele fotoprottegida que nas QAs ($p < 0,05$). Evidenciou-se expressão de fatores de atividade proliferativa, inflamatória e antiapoptótica na pele fotoexposta. Houve correlação positiva entre o grau de atipia e os marcadores p53, Ki-67, COX-2 e survivina ($p < 0,05$), assim como entre a marcação para COX-2 com p53, survivina e Ki-67 ($p < 0,05$).

Conclusões: A expressão de fatores proliferativos (Ki-67), inflamatórios (COX-2) e antiapoptóticos (survivina e p53) correlacionou-se positivamente com o grau de displasia da epiderme, e foi maior nas lesões de QAs que nos epitélios normais fotoexposto e fotoprottegido, indicando a existência de dano genômico tecidual subclínico.

Palavras-chave: Ceratose actínica, Apoptose, Raios Ultravioleta, Neoplasias, Carcinoma de Células Escamosas; p53; Survivina; Cox-2; fator nuclear kappa beta.

Abstract

Background: Actinic keratosis are proliferations of atypical keratinocytes, which can evolve into invasive cancer. The investigation of inflammation, apoptosis and cell proliferation pathways may contribute to the understanding of skin carcinogenesis in humans.

Objectives: To evaluate the expression of proliferation, resistance to apoptosis and inflammation markers in lesions of actinic keratosis, chronically sun-exposed adjacent skin and photoprotected.

Methods: Cross sectional study involving patients with actinic keratosis on the forearms. Skin fragments were obtained including lesions of actinic keratosis and perilesional photoexposed skin, and axillary skin fragment. The samples were submitted to immunohistochemical staining for p53, survivin, Ki-67, p105/p50 and COX-2. Nuclear staining was measured by HSCORE and cytoplasmic ones by the fraction of fields marked. The lesions were graded according to degree of atypia by keratinocytic intraepithelial neoplasia (KIN) index.

Results: A total of 38 actinic keratosis in 13 patients, whose ages ranged from 37 to 88 years, was evaluated, with eight KIN I lesions, 21 KIN II lesions and nine KIN III lesions. Ki-67, p53, survivin and COX-2 were less expressed in normal unexposed skin when compared to lesions ($p < 0.05$). The p105/p50 nuclear staining was more prominent in photoprotected skin than in AKs ($p < 0.05$). There was expression of proliferation, inflammatory and antiapoptotic factors in exposed skin. There was positive correlation between the degree of atypia and p53, Ki-67, COX-2 and survivin ($p < 0.05$), as well as between the staining for COX-2 with p53, survivin and Ki-67 ($p < 0.05$).

Conclusions: The expression of proliferative (Ki-67), inflammatory (COX-2) and antiapoptotic factors (surviving and p53) correlated positively with the degree of dysplasia of the epidermis, and was higher in AK lesions than in photoexposed and photoprotected normal skin, indicating the existence of subclinical tissue genomic damage.

Key-words: Actinic keratosis; Apoptosis; Ultraviolet rays; Neoplasms; Carcinoma, Squamous cell; Tumor Suppressor Protein p53, Survivin; Cox-2; Nuclear factor kappa beta.

Introdução

Queratoses actínicas (QAs) são neoplasias intraepiteliais de queratinócitos comuns em áreas fotoexpostas de indivíduos de pele clara, e apresentam risco (5-20%) de evolução para neoplasia invasiva. Seu desenvolvimento depende do desequilíbrio entre fatores de proliferação celular e apoptose, permitindo o acúmulo de mutações, induzidas principalmente por radiação ultravioleta B (UVB), nas populações celulares remanescentes.^{1,2}

Há uma intrincada rede de vias bioquímicas de ativação celular controladora da proliferação e apoptose dos queratinócitos, garantindo a homeostase dos tecidos e impedindo a carcinogênese. O estudo da expressão simultânea de marcadores teciduais

nas lesões permite a evidenciação dos fatores alterados, além da comparação com tecidos adjacentes ou não.³⁻⁷

O principal marcador de proliferação queratinocítica é o Ki-67 que está envolvido com a transcrição do RNA ribossomal e o ciclo celular. Índices de proliferação se correlacionam diretamente com invasividade e prognóstico de diversas neoplasias cutâneas.⁸⁻¹²

A proteína p53 é um importante supressor tumoral associado ao reparo ao DNA lesado, induz a apoptose de células que apresentam dano irreversível ao DNA, promove interrupção do ciclo celular e da angiogênese, impedindo a replicação de células mutantes.¹³⁻¹⁵

Survivina é uma das proteínas da família de inibidoras da apoptose (IAP), interferindo com a ativação das caspases 3 e 7. Também atua em importantes vias de mitose, desenvolvimento e diferenciação celulares.¹⁶⁻¹⁹

A enzima ciclo-oxigenase tipo 2 (COX-2) catalisa a conversão do ácido araquidônico em prostaglandina H₂, é expressa na epiderme após exposição ao UVB ou em dermatoses inflamatórias, exerce papel antiapoptótico, angiogênico e proliferativo em neoplasias queratinocíticas.²⁰⁻²³

Adicionalmente, a via do fator nuclear kappa beta (NF- κ B) que exerce atividade próinflamatória, controla a expressão de algumas proteínas antiapoptóticas das famílias Bcl-2 e IAP e proliferativas, como a ciclina D1 e a quinase dependente de ciclina 2.^{24,25} Vários cânceres estão associados a alterações dessa via, como: colorretal, estômago, ovário, próstata, laringe, esôfago e melanoma. O fator p105/p50 representa duas subunidades envolvidas na ativação da via NF- κ B, e sua expressão nuclear indica atividade tecidual da via.²⁵⁻³¹

A utilização de técnicas imuno-histoquímicas alia simplicidade, praticidade, acessibilidade, e permite a percepção geral simultânea das alterações morfofuncionais no tecido. Em conjunção com os dados clínicos e histopatológicos fornece informações sobre o comportamento biológico, indica investigações moleculares posteriores, além de contribuir com a concepção e constatação da efetividade de tratamentos.

Os autores objetivam avaliar a expressão de fatores ligados a diferentes vias de inflamação, apoptose e proliferação celular em QAs, epiderme fotoexposta e fotoprottegida.

Casuística e Métodos

Estudo tipo transversal, envolvendo pacientes adultos, de ambos os gêneros, portadores de QAs nos membros superiores atendidos no ambulatório de dermatologia da Faculdade de Medicina de Botucatu-SP, Unesp - Univ Estadual Paulista, durante o mês de junho/2011.

Foram excluídos pacientes que apresentassem lesões recidivadas de tratamentos prévios, com evidências de imunossupressão, exposição prévia à radioterapia oncológica ou fototerapia, uso de retinoides tópicos ou sistêmicos há menos de seis meses, uso de AINHS em qualquer dose e portadores de genodermatoses com propensão ao desenvolvimento de câncer de pele.

Após obtenção do consentimento esclarecido (Anexo 2), foram obtidos sob anestesia local: um fragmento fusiforme de pele englobando uma lesão de QA e pele normal perilesional dos membros superiores e outro de pele normal axilar (Figura 1).

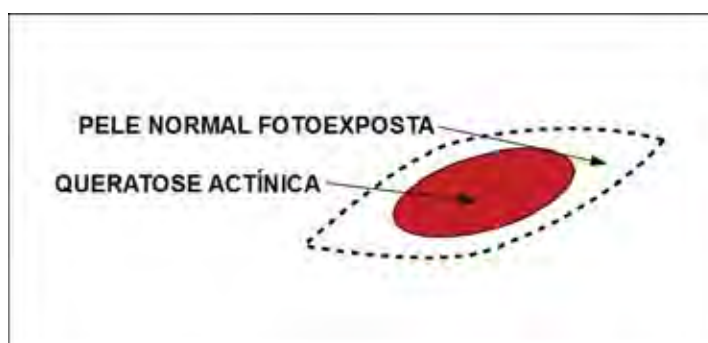


Figura 1. Representação esquemática da exérese fusiforme da queratose actínica e da amostragem da pele normal fotoexposta perilesional.

Objetivou-se a amostragem de 38 QAs, sendo incluídos consecutivamente todos os pacientes disponíveis que apresentassem critérios de inclusão (amostra por conveniência). Todo o processo de coleta dos fragmentos de pele e esclarecimento junto ao paciente foi realizado pelo pesquisador principal (J.V.S.).

Os fragmentos foram fixados em formalina 10% tamponada e incluídos em parafina no período máximo de 24 horas. Foram confeccionadas lâminas coradas em hematoxilina e eosina (HE) para confirmação diagnóstica por dermatopatologista experiente (M.E.A.M.) das QAs e estimativa da displasia a partir da graduação NIQ (neoplasia intraepitelial queratinocítica): I, II e III (Quadro 1).³² Para fins de correlação dos marcadores, a pele normal adjacente e fotoprotégida foram consideradas como NIQ grau 0.

Posteriormente, foram realizados cortes (4 μm) para a coloração por imunohistoquímica pelo método avidina-biotina-peroxidase,³³ empregando anticorpos monoclonais para: proteínas p53 (não-selvagem), Survivina, Ki-67, p105/p50 e COX-2 (Tabela 1). Foi realizado bloqueio da peroxidase endógena em água oxigenada 3% e recuperação antigênica pelo método do calor em câmara pressurizada. Os anticorpos primários foram incubados por 18h a 4^o C em câmara úmida. Como revelador, foi utilizado o cromógeno 3,3-diaminobenzidina (Dako, Carpinteria, CA, USA) contracorado por Giemsa, para diferenciar a melanina.^{34,35} Todas as diluições foram padronizadas segundo a mínima concentração discriminante visualmente. O controle positivo das marcações utilizado foi um caso de carcinoma espinocelular (CEC) e como controle negativo, foi omitido o anticorpo primário.

Quadro 1. Critérios para a classificação NIQ.³²

Grau	Definição
I	Hipercromia dos núcleos da camada basal e suprabasal; Variabilidade no tamanho dos queratinócitos; Variabilidade na perda de polarização nuclear dos queratinócitos; Ausência de hiperqueratose ou paraqueratose; Ausência de acometimento de anexos.
II	Proliferação atípica de queratinócitos nos 2/3 inferiores da epiderme; Aumento do índice mitótico; Nucléolos proeminentes; Irregularidade dos contornos dos queratinócitos; Alternância de ortoqueratose e paraqueratose; Acantólise; Aumento da pigmentação da camada basal.
III	Proliferação atípica de queratinócitos em todo epitélio; Extensão das atípias para os folículos; Perda da camada granulosa; Presença de paraqueratose; Doença de Bowen.

Tabela 1. Lista de anticorpos primários, fabricante/clone e diluição utilizados.

Anticorpo primário	Fabricante / clone	Diluição padronizada
Ki-67	DAKO / MIB-1, M7240	1/300
p53	DAKO / DO-7, M7001	1/150
Survivina	NeoMarkers / MS1203	1/800
COX-2	Cayman / CX229	1/400
p105/p50	Cell Signaling / 3035	1/100

A análise da marcação nuclear do Ki-67, survivina, p105/p50 e p53 foi realizada pelo cálculo do HSCORE, realizado nas áreas de maior marcação (*hotspot* ou *highspot*) do tecido amostrado, sob visualização em microscópio de luz (400x). O HSCORE se baseia na soma da multiplicação da percentagem de núcleos fortemente marcados por três, dos moderadamente marcados por dois e os pouco marcados por um, resultando em um escore que varia de zero a 300, para cada campo amostrado. Foi descrito originariamente por Ishibashi e colaboradores, em 2003, para quantificação de marcação nuclear de receptores de hormônios sexuais.³⁶

Para a análise da marcação da COX-2, todos os campos histológicos da epiderme foram avaliados na lesão, pele adjacente e pele fotoprotegida. O valor de cada tecido amostrado resultou da fração de campos em que se observava positividade do marcador.

Dados quantitativos foram representados pelas médias e desvios padrão ou pela mediana e quartis (1º. e 3º.) se a normalidade não fosse evidenciada pelo teste de Shapiro-Wilk; e foram comparados pareadamente a partir de modelo linear generalizado misto. A correlação da expressão de proteínas das vias de apoptose e proliferação entre si e com o grau de displasia foi avaliada pelo coeficiente de correlação linear (r) de Spearman. Dados qualitativos foram comparados entre si pelo teste do qui-quadrado, o ajuste multivariado foi realizado a partir de regressão logística múltipla e o efeito de associação foi estimado pela razão de chances (*odds ratio*). Valores ausentes ou outliers (>3 desvios padrão) foram tratados por imputação múltipla.³⁷

Os dados foram analisados pelo software IBM SPSS 20.0.³⁸ Foram considerados significativos valores de $p < 0,05$.

O dimensionamento amostral se baseou na estimativa do aumento de mais que 30% na expressão de fatores proliferativos e antiapoptóticos entre pele normal e QAs para detectar diferenças com poder de 80% e nível alfa de 5%.³⁹

O projeto foi aprovado pelo comitê de ética e pesquisa da instituição (CEP no. 3424-2010 - Anexo 1).

Resultados

Foram incluídos no estudo 13 pacientes: quatro mulheres e nove homens, cujas idades variaram de 37 a 88 anos, em que foram amostradas 38 QAs. As QAs apresentaram diferentes graus de displasia (NIQ): 8 (21%) grau I, 21 (55%) grau II e 9 (24%) grau III.

Foram contabilizados, em média, 102 núcleos por campo histológico amostrado (400x). As expressões de cada marcador estão representadas na figura 2 e os valores dispostos na tabela 2.

Tabela 2. Expressão dos marcadores em cada tecido amostrado.

Anticorpo primário	Queratose actínica (N=38)	Pele perilesional (N=38)	Pele fotoprottegida (N=13)
Ki-67 ^a	117,8±31,1*	65,5±36,3 [¥]	42,5±18,2 [#]
p53 ^a	147,6±36,7*	82,8±44,9 [£]	60,1±41,3 [#]
Survivina ^a	88,4±20,4*	45,7±26,2	53,3±32,6 [#]
COX-2 ^b	0,68±0,19*	0,45±0,23 [¥]	0,26±0,26 [#]
p105/p50 ^{a,c}	0 (0-14)	8 (0-13) [¥]	0 (0-10)

^a HSCORE (0 a 300) – média±desvio padrão; ^b Fração de campos positivos – média±desvio padrão; ^c mediana (1°. -3°. quartis)

* p<0,05 QAxPerilesional; # p<0,05 QAxFotoprottegida; ¥ p<0,05 PerilesionalxFotoprottegida; £ p=0,08.

Todos os tecidos amostrados apresentaram marcação para Ki-67; survivina, COX-2, p105/p50. Apenas quatro amostras (3 QAs e 1 pele axilar) não apresentaram marcação para p53.

A expressão predominante de survivina foi nuclear, mais frequente nas QAs (100,0%), que no epitélio perilesional (73,7%) e fotoprottegido (73,7%) (p<0,01). Já a marcação citoplasmática foi mais comum na pele perilesional (60,5%) que nas QAs (18,4%) ou pele axilar (38,5%) (p<0,01). Quando avaliadas a expressão de survivina nuclear e citoplasmática conjuntamente, houve associação inversa entre a marcação citoplasmática e lesões de QAs (razão de chances = 0,2; p<0,01). Não houve interação significativa entre a expressão nuclear ou citoplasmática (p>0,1).

Houve fraca expressão de COX-2 na derme das lesões, havendo conformidade com o infiltrado inflamatório presente.

A expressão predominante do p105/p50 foi citoplasmática em todos os fragmentos de epidermes avaliados. A intensidade de marcação citoplasmática da pele fotoprottegida foi menor que nas QAs e peles fotoexpostas perilesionais (p<0,01).

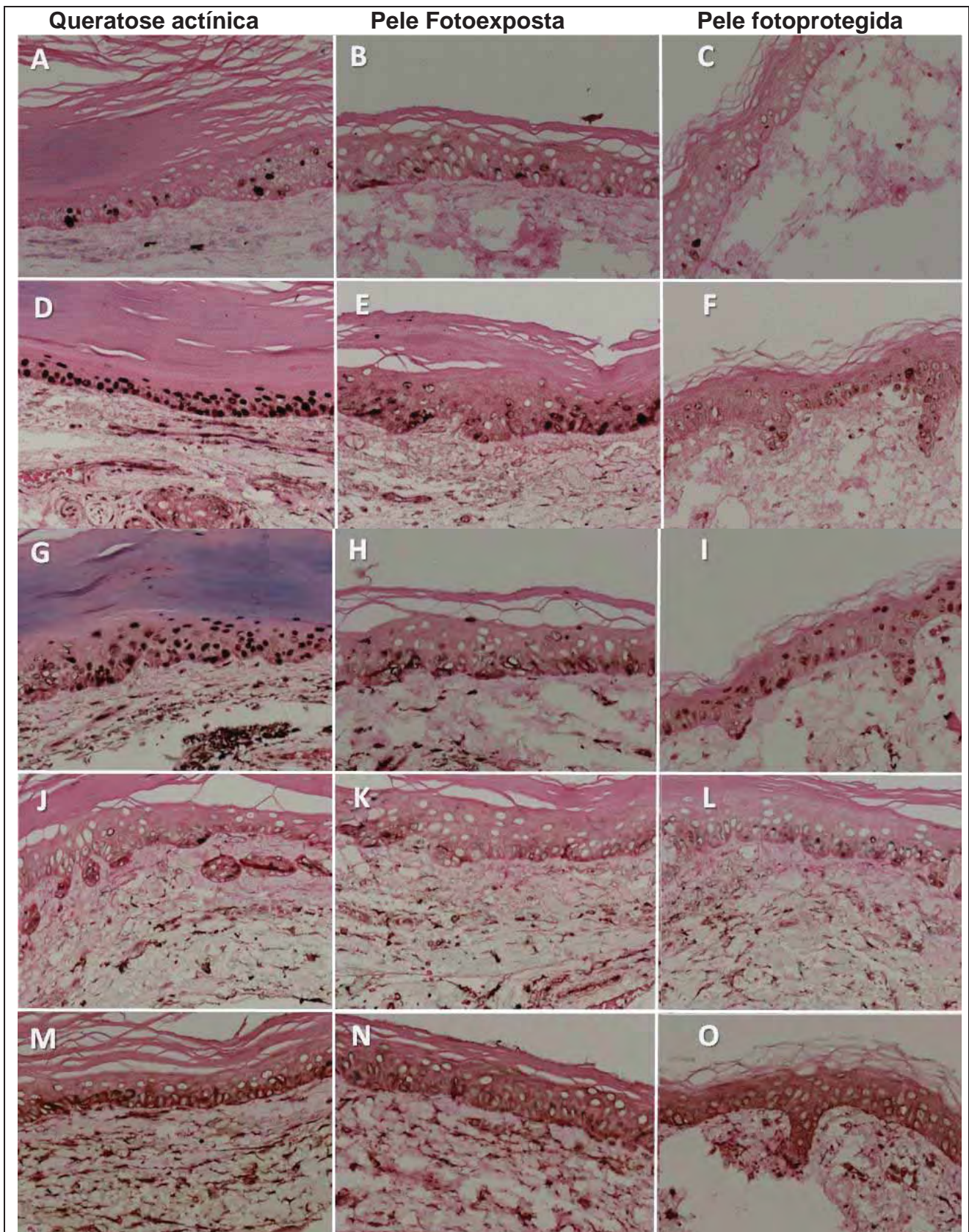


Figura 2. Expressão de marcadores de proliferação e apoptose nos epitélios amostrados (Giemsa-DA; 200x): Ki-67 (A, B, C), p53 (D, E, F), survivina (G, H, I), COX-2 (J, K, L) e p105/p50 (M, N, O).

A correlação da expressão entre os marcadores teciduais está disposta na tabela 3 e apêndice 2. Destacam-se as correlações positivas significativas entre os marcadores, exceto para p105/p50.

Tabela 3. Correlação linear (r_{Spearman}) entre os marcadores imuno-histoquímicos de proliferação e apoptose.

Anticorpo primário	p53 ^a	Survivina ^a	COX-2 ^b	p105/p50 ^a	NIQ ^c
Ki-67 ^a	0,52*	0,46*	0,28*	-0,06	0,66*
p53 ^a	-	0,51*	0,27*	0,10	0,61*
Survivina ^a	-	-	0,29*	0,07	0,64*
COX-2 ^b	-	-	-	0,12	0,50*
p105/p50 ^a	-	-	-	-	-0,05

^a HSCORE; ^b Fração de campos positivos; ^c Neoplasia intraepitelial queratinocítica; * $p < 0,02$.

Discussão

O presente estudo demonstrou progressiva expressão de fatores antiapoptóticos (p53) e inflamatórios (COX-2) e fatores de proliferação (Ki-67) da pele fotoprottegida em relação à pele fotoexposta e QAs, evidenciando que a exposição crônica à radiação ultravioleta (RUV) promove alterações teciduais que tornam toda área exposta susceptível à carcinogênese (campo de cancerização). Esse achado é substanciado pela correlação entre a expressão desses fatores e o grau de displasia do epitélio.

Carcinogênese é um fenômeno complexo que depende do sucesso de mutações no DNA, gerando imortalização e replicação celular. RUV, especialmente UVB, é um carcinógeno que age nas fases de iniciação e promoção das principais neoplasias cutâneas, constituindo o agente ambiental mais importante na dermatologia.⁴⁰

A adequada manutenção tecidual envolve a indução, por meios genéticos, da apoptose de células senescentes ou alteradas, com alto grau de especificidade e eficiência, mantendo a morfogênese e a homeostase.^{41,42} Falhas nos mecanismos de regulação ou execução da apoptose estão relacionadas a uma ampla gama de doenças, incluindo neoplasias.⁴¹

Alterações na proteína p53 são descritas em mais de 90% das neoplasias malignas. Entre as neoplasias queratinocíticas, ocorrem em 50-81% das QAs, 70% das doenças de Bowen, 90-100% dos CECs e 70-74% dos carcinomas basocelulares.^{43,44}

UVB promove uma mutação específica no gene da proteína p53 (*fingerprint*), possibilitando a investigação específica em neoplasias induzidas pela RUV por técnicas de detecção molecular, como o PCR (*polymerase chain reaction*).^{40,45}

O antígeno Ki-67 é um marcador de proliferação celular frequentemente utilizado para identificar a proporção de células proliferativas em um tecido, sendo identificado em 19-24% das células em QAs. É associado à invasividade e pior prognóstico de neoplasias queratinocíticas.^{9,46}

Na pele fotoexposta, clinicamente normal, ocorre a formação de agrupamentos de queratinócitos que expressam p53 e Ki-67 de forma isolada, evidenciando clones mutantes, em proliferação, com potencial de desenvolvimento de QA ou CEC local.^{4,47} Em nosso estudo, esses agrupamentos representavam as áreas *hotspot* do epitélio e foram avaliados como representantes do tecido, já que se evidenciava franca instabilidade genômica local, elevando seu HSCORE. Entretanto, na maior parcela dos campos suplementares, os queratinócitos não evidenciavam alterações significativas (Figura 3).

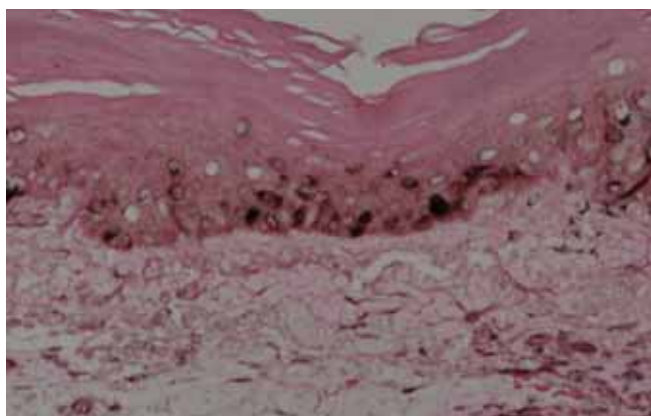


Figura 3. Clones de queratinócitos marcados por p53 em meio ao epitélio fotoexposto não marcado.

A expressão nuclear de survivina está associada ao comportamento neoplásico de tecidos e maior agressividade de tumores e, por esse motivo, preferiu-se estimá-la a partir do HSCORE.^{17,48,49} Há poucos estudos, com diferentes técnicas, que avaliaram a expressão de survivina em QAs, porém, esteve presente em 83% das lesões analisadas por hibridização *in situ*.¹⁶ Apesar de estar primariamente associada a neoplasias malignas, a expressão aumentada de survivina também ocorre em hiperproliferações benignas de pele como observado em lesões de psoríase, queratose seborreica e verruga vulgar.¹⁶ Em nossa casuística, verificamos positividade para survivina em todos os tipos

de tecido estudados, porém, na pele normal, prevaleceu a localização citoplasmática, ao contrário das QAs, que foram mais frequentemente nucleares.

Ao contrário de alguns estudos, verificamos positividade nuclear para survivina na pele normal, o que pode ser explicado pela exposição antigênica decorrente da técnica de preparo das colorações.¹⁶

Survivina também participa da via de sinalização Wnt/ β -catenina que desempenha papel importante na carcinogênese cutânea contribuindo para o desenvolvimento de QAs e CECs.⁵⁰⁻⁵² Recentemente, foi proposto que a expressão de survivina constitua um evento precoce do desenvolvimento neoplásico atuando na etapa de iniciação de células-tronco tumorais. A epiderme é continuamente suprida por queratinócitos derivados de células progenitoras e, portanto, mutações adquiridas nestas células podem induzir a transdiferenciação em células-tronco tumorais as quais proliferam como células malignas.¹⁷

COX-2 é uma enzima classicamente associada com a resposta inflamatória, porém, nas últimas décadas, foi reconhecido seu papel na carcinogênese, estando associada a neoplasias de diversas origens teciduais. Além de estimular a proliferação celular e a angiogênese, demonstrou-se que a elevação da COX-2 está relacionada à resistência a apoptose em vários tumores, tais como colorretal, mama, pulmão e próstata.^{21,23}

Na pele normal a COX-2 é induzida pela radiação UV e está hiperexpressa em CECs (50%) e QAs (50%).^{43,53} Nossos dados corroboram esses resultados ao mostrarem aumento na fração de campos marcados nas lesões em comparação com a pele normal fotoexposta e fotoprotégida. Além disso, houve significativa correlação entre a expressão da COX-2 e dos marcadores de proliferação e resistência a apoptose estudados, assim como com maiores graus de atipia celular.

NF- κ B é um fator de transcrição envolvido em várias funções celulares, particularmente, na resposta a agressões, regeneração e inflamação.⁵⁴ Aliás, alterações dessa via estão associadas ao desenvolvimento de certas neoplasias. Exposição à radiação UV ativa o NF- κ B por vias precoces, como a inibição da transcrição do seu inibidor (I κ B), ou mesmo, independentemente da inativação de I κ B.⁵⁵⁻⁵⁸

Há uma atuação múltipla e controversa do NF- κ B na apoptose, por uma via inativando e, por outra, ativando a via JNK, a qual atua na indução da apoptose.^{59,60}

O estresse oxidativo induzido pelo UVB parece promover a expressão de proteínas envolvidas na inflamação e no ciclo celular como a iNOS, COX-2 e ciclina D1 pela via MAPK/ NF- κ B.⁵⁴ A ativação do receptor TNF-R1 pode ativar o NF- κ B através da via TRAF-

2, por outro lado a região promotora do TNF α apresenta um sítio consensual de ligação para o NF- κ B, indicando que ele deve estar associado a liberação de TNF α induzida pelo UV.⁶¹

A ativação do NF- κ B em queratinócitos imortalizados (HaCaT) exerce importante papel na promoção do desenvolvimento tumoral, sendo que o estímulo proliferativo verificado pelo TNF α é dependente desta via. Esses dados se mostram inversos aos achados do efeito do NF- κ B sobre queratinócitos normais, onde a sua ativação tem efeito antineoplásico. Isso indica que alterações preliminares em genes supressores tumorais como o p53 ou p21, que estão presentes em células HaCaT, criariam um ambiente que propicia o efeito proliferativo e antiapoptótico do NF- κ B.^{62,63} Em suma, a ativação do NF- κ B teria efeito antineoplásico em queratinócitos normais, porém pró-neoplásico em queratinócitos com alterações genéticas precoces no processo carcinogênico, como a inativação de genes supressores tumorais.

Em concordância com as observações da sua atuação paradoxal, os nossos dados não mostraram correlação significativa entre a marcação nuclear para p105/p50 e outros fatores de proliferação e apoptose, porém, descreve-se originalmente, a expressão comparativa de p105/p50 nas QAs, pele fotoexposta e fotoprotetida. Esses achados indicam a necessidade do estudo pormenorizado da participação da via do NF- κ B no processo de carcinogênese cutânea, vislumbrando, inclusive, o desenvolvimento de estratégias terapêuticas ou preventivas.

A família Bcl-2, inclui um grupo de proteínas evolucionariamente correlacionadas que atuam na permeabilidade da membrana externa mitocondrial, com efeitos antiapoptóticos, como as unidades Bcl-2, Bcl-xL e Bcl-w, ou com efeitos proapoptóticos, como as unidades Bax, Bak e Bok.⁶⁴ A expressão da proteína Bcl-2 foi avaliada em diversos estudos com QAs, sendo evidenciada entre 25% e 100% das lesões, principalmente nas formas hipertróficas, sugerindo maior risco de progressão dessas lesões para doença invasiva.⁶⁵⁻⁶⁷

Neste estudo, foram exploradas e correlacionadas as expressões de fatores de diferentes vias de proliferação, inflamação e apoptose em QAs, pele fotoexposta e pele fotoprotetida, além da displasia do epitélio. Ao passo que a avaliação simultânea desses tecidos favoreceu o entendimento da dinâmica em relação ao estímulo carcinogênico do UV, a exploração meticulosa de fatores consecutivos de vias individuais, sistemas de controle pós-transcricional, ou mesmo o polimorfismo gênico desses peptídeos envolvidos

permitiria um conhecimento mais apurado do processo, o que deve ser conduzido posteriormente.

A análise quantitativa da marcação imuno-histoquímica é influenciada por fatores que dependem do tecido, da doença estudada, da fixação, do tempo de armazenagem, da espessura do corte, da contracoloração, do anticorpo utilizado, da padronização da técnica, de componentes humanos da confecção das lâminas, da qualidade do microscópio, sua intensidade de luz e aspectos subjetivos do avaliador.⁶⁸⁻⁷⁰

Adicionalmente, não há uma relação linear (estequiométrica) entre a quantidade de proteína e a intensidade do sinal da imagem, o que ocorre principalmente pela saturação da cor e da escala exponencial de luminância nas fotos digitais. Isso exige cautela na interpretação de resultados quantitativos que se baseiem unicamente na intensidade da marcação.⁷¹⁻⁷³

O emprego do HSCORE como estimativa semiquantitativa de marcação imuno-histoquímica é bastante reprodutível e absorve informação relativa simultaneamente ao percentual de núcleos e sua intensidade de marcação, apesar da contagem tender a subestimar campos muito intensamente marcados e superestimar os menos marcados. Técnicas morfométricas digitais apresentam alta correlação com HSCORE, com a vantagem da exclusão da subjetividade do avaliador (Anexo 5)^{36,74,75} Entretanto, a escolha do campo amostrado (*hotspot*) interfere significativamente no resultado, visto que podem não ser representativos da maior fração do tecido, como a existência de agrupamentos isolados de células marcadas,⁴ ou decorrerem de artefatos de processamento da lâmina.

Além disso, a variabilidade interna entre as classificações subjetivas do HSCORE (núcleos muito, médio e pouco marcados) pode reduzir a variabilidade interna das amostras, reduzindo o poder em testes estatísticos. O uso de técnicas morfométricas digitais adequadamente validadas pode suplantar esses problemas, assim como aumentar a agilidade da análise em um número maior de campos amostrados.

Quando o marcador é expresso de forma irregular, ou infrequente no tecido, a ampliação do número de campos amostrados ou mesmo, a análise do número de campos positivos em relação ao todo pode representar melhor o fenômeno. O cálculo da fração de campos com núcleos marcados se correlaciona linearmente com o HSCORE dos *hotspots* em tecidos com distribuição homogênea das marcações (Apêndice 1).

QAs e queilites actínicas devem ser percebidas como modelos de carcinogênese cutâneo-mucosas em humanos. Além da sua incidência, a expressão diferencial de

fatores de proliferação celular ou das diferentes vias intrínsecas de apoptose na pele fotoprotégida, fotoexposta e lesional permitem a investigação clínica de fatores de risco epidemiológicos, ou o ensaio de medidas preventivas contra o CEC de pele e mucosas.

O conhecimento das alterações nas vias de apoptose, inflamação e do ciclo celular permite o desenvolvimento de medidas pontuais que interfiram nas fases da carcinogênese cutânea, especialmente em pacientes de alto risco, como albinos, imunossuprimidos ou portadores de síndromes genéticas predisponentes ao câncer de pele.⁷⁶⁻⁸⁰

O uso regular de filtro solar reduz a incidência de QAs e CECs em até 40% de pacientes imunocompetentes, e em até 30% de novas QAs em imunossuprimidos por transplante de órgãos sólidos.⁸¹⁻⁸⁴ Histologicamente, a expressão de p53 na epiderme fotoexposta é reduzida pela metade em usuários regulares de fotoprotetores, e nos fragmentos de pele coletados nos meses de inverno.^{47,85}

Recentemente, a inclusão de fatores anti-inflamatórios e antioxidantes nos filtros solares, busca atenuar o efeito de outras vias, como NF- κ B, e ativação de metaloproteinases dérmicas no processo de envelhecimento e carcinogênese.⁸⁶⁻⁸⁹

Anti-inflamatórios não-hormonais e aspirina promovem o bloqueio da COX-2 e, provavelmente, do NF- κ B, com potencial de intervenção na carcinogênese. Entre usuários regulares de AINHS por mais de um ano, mesmo em doses baixas, houve menor risco de CEC (razão de chances = 0,2) e menor contagem de QAs (razão de chances = 0,5).⁹⁰ Resultados semelhantes quanto ao CEC foram encontrados em um estudo populacional com 1484 participantes, verificando redução de risco com vários AINHS, principalmente o AAS, e mais intensamente para tumores positivos para p53 ou com perda de heterozigose do gene PTCH.⁹¹

Um estudo aberto verificou significativa redução nas QAs pelo uso tópico de gel de diclofenaco de sódio, um potente inibidor da COX-1 e 2, resultando em 81% de resposta completa.⁹² Diversos estudos subsequentes corroboraram este achado.⁹³⁻¹⁰¹

As abordagens citotóxicas para o tratamento das QAs incluem a terapia fotodinâmica, que interfere com o ciclo celular das células em rápida proliferação, atingindo taxas de resposta de cerca de 70-90%, especialmente, nas lesões menos hiperqueratósicas.^{102,103} O mebutato de ingenol é um novo agente citotóxico que demonstrou rápido efeito em 56-75% das QAs e nas células displásicas do epitélio adjacente.¹⁰⁴

Técnicas físicas e destrutivas como a laserterapia, ácido tricloroacético e crioterapia com nitrogênio líquido são eficientes tratamentos de QAs visando também à prevenção da transformação invasiva, porém, carecem de especificidade para as células displásicas, devendo ser suplantados pelos tratamentos de “campo” e medidas de quimioprevenção.¹⁰⁵⁻¹⁰⁷ A exploração de vias de escape da carcinogênese deve subsidiar o progresso dessa abordagem no desenvolvimento de novas estratégias de abordagem das QAs.

Conclusões

A expressão de fatores proliferativos (Ki-67), inflamatórios (COX-2) e antiapoptóticos (survivina e p53) correlacionou-se positivamente com o grau de displasia da epiderme, e foi maior nas QAs que nos epitélios fotoprotegido e fotoexposto, indicando a existência de dano genômico tecidual subclínico e risco de neoplasia subsequente.

REFERÊNCIAS:

1. Lebwohl M. Actinic keratosis: epidemiology and progression to squamous cell carcinoma. *Br J Dermatol* 2003;149 Suppl 66:31-3.
2. Rossi R, Mori M, Lotti T. Actinic keratosis. *Int J Dermatol* 2007;46:895-904.
3. Giannetti L, Consolo U, Magnoni C, Lo Muzio L. Apoptosis: escaping strategies in human skin cancer (Review). *Oncol Rep* 2004;11:401-5.
4. Carpenter PM, Linden KG, McLaren CE, et al. Nuclear morphometry and molecular biomarkers of actinic keratosis, sun-damaged, and nonexposed skin. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004;13:1996-2002.
5. Pustisek N, Situm M. UV-radiation, apoptosis and skin. *Coll Antropol* 2011;35 Suppl 2:339-41.
6. Batinac T, Zamolo G, Ruzic A, Persic V. Apoptosis in skin cancer development and regression. *Coll Antropol* 2007;31 Suppl 1:23-8.
7. Raj D, Brash DE, Grossman D. Keratinocyte apoptosis in epidermal development and disease. *J Invest Dermatol* 2006;126:243-57.
8. Erb P, Ji J, Kump E, Mielgo A, Wernli M. Apoptosis and pathogenesis of melanoma and nonmelanoma skin cancer. *Adv Exp Med Biol* 2008;624:283-95.
9. Talghini S, Halimi M, Baybordi H. Expression of P27, Ki67 and P53 in squamous cell carcinoma, actinic keratosis and Bowen disease. *Pak J Biol Sci* 2009;12:929-33.
10. Tu TJ, Ma MW, Monni S, et al. A high proliferative index of recurrent melanoma is associated with worse survival. *Oncology* 2011;80:181-7.
11. Jensen V, Prasad AR, Smith A, et al. Prognostic criteria for squamous cell cancer of the skin. *J Surg Res* 2010;159:509-16.
12. Yerebakan O, Ciftcioglu MA, Akkaya BK, Yilmaz E. Prognostic value of Ki-67, CD31 and epidermal growth factor receptor expression in basal cell carcinoma. *J Dermatol* 2003;30:33-41.
13. Nayak SK, Panesar PS, Kumar H. p53-Induced apoptosis and inhibitors of p53. *Curr Med Chem* 2009;16:2627-40.
14. Nelson MA, Einspahr JG, Alberts DS, et al. Analysis of the p53 gene in human precancerous actinic keratosis lesions and squamous cell cancers. *Cancer Lett* 1994;85:23-9.
15. Mehregan D. Immunohistochemistry: a prognostic as well as diagnostic tool? *Semin Cutan Med Surg* 1996;15:317-25.
16. 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.
17. Bongiovanni L, Muller EJ, Della Salda L. Survivin in skin pathologies. *Exp Dermatol* 2011;20:457-63.

18. Dallaglio K, Marconi A, Pincelli C. Survivin: a dual player in healthy and diseased skin. *J Invest Dermatol* 2012;132:18-27.
19. Dallaglio K, Palazzo E, Marconi A, et al. Endogenous survivin modulates survival and proliferation in UVB-treated human keratinocytes. *Exp Dermatol* 2009;18:464-71.
20. Akunda JK, Chun KS, Sessoms AR, Lao HC, Fischer SM, Langenbach R. Cyclooxygenase-2 deficiency increases epidermal apoptosis and impairs recovery following acute UVB exposure. *Mol Carcinog* 2007;46:354-62.
21. Fecker LF, Stockfleth E, Nindl I, Ulrich C, Forschner T, Eberle J. The role of apoptosis in therapy and prophylaxis of epithelial tumours by nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). *Br J Dermatol* 2007;156 Suppl 3:25-33.
22. Rundhaug JE, Fischer SM. Cyclo-oxygenase-2 plays a critical role in UV-induced skin carcinogenesis. *Photochem Photobiol* 2008;84:322-9.
23. Tjiu JW, Liao YH, Lin SJ, et al. Cyclooxygenase-2 overexpression in human basal cell carcinoma cell line increases antiapoptosis, angiogenesis, and tumorigenesis. *J Invest Dermatol* 2006;126:1143-51.
24. Eberle J, Fecker LF, Forschner T, Ulrich C, Rowert-Huber J, Stockfleth E. Apoptosis pathways as promising targets for skin cancer therapy. *Br J Dermatol* 2007;156 Suppl 3:18-24.
25. Gao K, Dai DL, Martinka M, Li G. Prognostic significance of nuclear factor-kappaB p105/p50 in human melanoma and its role in cell migration. *Cancer Res* 2006;66:8382-8.
26. Song S, Chen D, Lu J, et al. NFKB1 and NFKBIA polymorphisms are associated with increased risk for sporadic colorectal cancer in a southern Chinese population. *PLoS One* 2011;6:e21726.
27. Bu H, Rosdahl I, Sun XF, Zhang H. Importance of polymorphisms in NF-kappaB1 and NF-kappaB1alpha genes for melanoma risk, clinicopathological features and tumor progression in Swedish melanoma patients. *J Cancer Res Clin Oncol* 2007;133:859-66.
28. Gao J, Pfeifer D, He LJ, et al. Association of NFKBIA polymorphism with colorectal cancer risk and prognosis in Swedish and Chinese populations. *Scand J Gastroenterol* 2007;42:345-50.
29. Zhang P, Wei Q, Li X, et al. A functional insertion/deletion polymorphism in the promoter region of the NFKB1 gene increases susceptibility for prostate cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 2009;191:73-7.
30. Zou YF, Yuan FL, Feng XL, et al. Association between NFKB1 -94ins/delATTG promoter polymorphism and cancer risk: a meta-analysis. *Cancer Invest* 2011;29:78-85.
31. Kang MR, Kim MS, Kim SS, Ahn CH, Yoo NJ, Lee SH. NF-kappaB signalling proteins p50/p105, p52/p100, RelA, and IKKepsilon are over-expressed in oesophageal squamous cell carcinomas. *Pathology* 2009;41:622-5.
32. Ramos-Ceballos FI, Ounpraseuth ST, Horn TD. Diagnostic concordance among dermatopathologists using a three-tiered keratinocytic intraepithelial neoplasia grading scheme. *J Cutan Pathol* 2008;35:386-91.
33. Hsu SM, Raine L, Fanger H. The use of antiavidin antibody and avidin-biotin-peroxidase complex in immunoperoxidase technics. *Am J Clin Pathol* 1981;75:816-21.
34. Salvio AG, Ribeiro DA, Marques ME. Identification of neoplastic cells in the lymphocytic infiltrate associated with thin melanomas. *Histopathology* 2007;50:942-4.
35. Miot LD, Miot HA, Polettini J, Silva MG, Marques ME. Morphologic changes and the expression of alpha-melanocyte stimulating hormone and melanocortin-1 receptor in melasma lesions: a comparative study. *Am J Dermatopathol* 2010;32:676-82.
36. Ishibashi H, Suzuki T, Suzuki S, et al. Sex steroid hormone receptors in human thymoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:2309-17.
37. Norman GR, Streiner DL. *Biostatistics. The bare essentials*. 3rd ed. Shelton, Connecticut: People's Medical Publishing House; 2008.
38. IBM SPSS 20.0 for Windows. In. 20 ed. Chicago (IL): SPSS Incorporation; 2011:Statistical Package for Social Science (SPSS).
39. Miot HA. Tamanho da amostra em estudos clínicos e experimentais. *J Vasc Bras* 2011;10:275-8.
40. Leffell DJ. The scientific basis of skin cancer. *J Am Acad Dermatol* 2000;42:18-22.
41. Meier P, Finch A, Evan G. Apoptosis in development. *Nature* 2000;407:796-801.
42. Lo Muzio L, Staibano S, Pannone G, et al. Expression of the apoptosis inhibitor survivin in aggressive squamous cell carcinoma. *Exp Mol Pathol* 2001;70:249-54.
43. Kim KH, Park EJ, Seo YJ, et al. Immunohistochemical study of cyclooxygenase-2 and p53 expression in skin tumors. *J Dermatol* 2006;33:319-25.
44. Sutter C, Wersin R, Varnai M, Friemann J. [Elevated p53 protein expression in normal and neoplastic light-exposed epidermis]. *Verh Dtsch Ges Pathol* 1994;78:246-51.
45. Roewert-Huber J, Stockfleth E, Kerl H. Pathology and pathobiology of actinic (solar) keratosis - an update. *Br J Dermatol* 2007;157 Suppl 2:18-20.

46. Matsuta M, Kimura S, Kosegawa G, Kon S. Immunohistochemical detection of Ki-67 in epithelial skin tumors in formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections using a new monoclonal antibody (MIB-1). *J Dermatol* 1996;23:147-52.
47. Ponten F, Berne B, Ren ZP, Nister M, Ponten J. Ultraviolet light induces expression of p53 and p21 in human skin: effect of sunscreen and constitutive p21 expression in skin appendages. *J Invest Dermatol* 1995;105:402-6.
48. Garrido-Ruiz MC, Requena L, Ortiz P, Perez-Gomez B, Alonso SR, Peralto JL. The immunohistochemical profile of Spitz nevi and conventional (non-Spitzoid) melanomas: a baseline study. *Mod Pathol* 2010;23:1215-24.
49. Goteri G, Simonetti O, Rupoli S, et al. Differences in survivin location and Bcl-2 expression in CD30+ lymphoproliferative disorders of the skin compared with systemic anaplastic large cell lymphomas: an immunohistochemical study. *Br J Dermatol* 2007;157:41-8.
50. Tataroglu C, Karabacak T, Apa DD. Beta-catenin and CD44 expression in keratoacanthoma and squamous cell carcinoma of the skin. *Tumori* 2007;93:284-9.
51. Brasanac D, Boricic I, Todorovic V, Tomanovic N, Radojevic S. Cyclin A and beta-catenin expression in actinic keratosis, Bowen's disease and invasive squamous cell carcinoma of the skin. *Br J Dermatol* 2005;153:1166-75.
52. Takahashi-Yanaga F, Kahn M. Targeting Wnt signaling: can we safely eradicate cancer stem cells? *Clin Cancer Res* 2010;16:3153-62.
53. Buckman SY, Gresham A, Hale P, et al. COX-2 expression is induced by UVB exposure in human skin: implications for the development of skin cancer. *Carcinogenesis* 1998;19:723-9.
54. Sharma SD, Meeran SM, Katiyar SK. Dietary grape seed proanthocyanidins inhibit UVB-induced oxidative stress and activation of mitogen-activated protein kinases and nuclear factor-kappaB signaling in in vivo SKH-1 hairless mice. *Mol Cancer Ther* 2007;6:995-1005.
55. Bender K, Gottlicher M, Whiteside S, Rahmsdorf HJ, Herrlich P. Sequential DNA damage-independent and -dependent activation of NF-kappaB by UV. *Embo J* 1998;17:5170-81.
56. Muthusamy V, Piva TJ. The UV response of the skin: a review of the MAPK, NFkappaB and TNFalpha signal transduction pathways. *Arch Dermatol Res* 2010;302:5-17.
57. Lewis DA, Spandau DF. UVB activation of NF-kappaB in normal human keratinocytes occurs via a unique mechanism. *Arch Dermatol Res* 2007;299:93-101.
58. Li N, Karin M. Ionizing radiation and short wavelength UV activate NF-kappaB through two distinct mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:13012-7.
59. Yuan ZQ, Gottlieb B, Beitel LK, et al. Polymorphisms and HNPCC: PMS2-MLH1 protein interactions diminished by single nucleotide polymorphisms. *Hum Mutat* 2002;19:108-13.
60. Liu J, Yang D, Minemoto Y, Leitges M, Rosner MR, Lin A. NF-kappaB is required for UV-induced JNK activation via induction of PKCdelta. *Mol Cell* 2006;21:467-80.
61. Pupe A, Degreef H, Garmyn M. Induction of tumor necrosis factor-alpha by UVB: a role for reactive oxygen intermediates and eicosanoids. *Photochem Photobiol* 2003;78:68-74.
62. Basile JR, Eichten A, Zacny V, Munger K. NF-kappaB-mediated induction of p21(Cip1/Waf1) by tumor necrosis factor alpha induces growth arrest and cytoprotection in normal human keratinocytes. *Mol Cancer Res* 2003;1:262-70.
63. Qing G, Yan P, Xiao G. Hsp90 inhibition results in autophagy-mediated proteasome-independent degradation of IkappaB kinase (IKK). *Cell Res* 2006;16:895-901.
64. Frenzel A, Grespi F, Chmielewski W, Villunger A. Bcl2 family proteins in carcinogenesis and the treatment of cancer. *Apoptosis* 2009;14:584-96.
65. Nakagawa K, Yamamura K, Maeda S, Ichihashi M. bcl-2 expression in epidermal keratinocytic diseases. *Cancer* 1994;74:1720-4.
66. Stanimirovic A, Cupic H, Bosnjak B, Kruslin B, Belicza M. Expression of p53, bcl-2 and growth hormone receptor in actinic keratosis, hypertrophic type. *Arch Dermatol Res* 2003;295:102-8.
67. Tomas D, Kruslin B, Cupic H, et al. Correlation between Bcl-2 and Bax in atrophic and hypertrophic type of actinic keratosis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2006;20:51-7.
68. Fritschy JM. Is my antibody-staining specific? How to deal with pitfalls of immunohistochemistry. *Eur J Neurosci* 2008;28:2365-70.
69. Bussolati G, Leonardo E. Technical pitfalls potentially affecting diagnoses in immunohistochemistry. *J Clin Pathol* 2008;61:1184-92.
70. Anagnostou VK, Welsh AW, Giltneane JM, et al. Analytic variability in immunohistochemistry biomarker studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2010;19:982-91.
71. Walker RA. Quantification of immunohistochemistry--issues concerning methods, utility and semiquantitative assessment I. *Histopathology* 2006;49:406-10.

72. Taylor CR, Levenson RM. Quantification of immunohistochemistry--issues concerning methods, utility and semiquantitative assessment II. *Histopathology* 2006;49:411-24.
73. Kokolakis G, Panagis L, Stathopoulos E, Giannikaki E, Tosca A, Kruger-Krasagakis S. From the protein to the graph: how to quantify immunohistochemistry staining of the skin using digital imaging. *J Immunol Methods* 2008;331:140-6.
74. Baddoura FK, Cohen C, Unger ER, DeRose PB, Chenggis M. Image analysis for quantitation of estrogen receptor in formalin-fixed paraffin-embedded sections of breast carcinoma. *Mod Pathol* 1991;4:91-5.
75. Gunduz K, Demireli P, Vatansever S, Inanir I. Examination of bcl-2 and p53 expressions and apoptotic index by TUNEL method in psoriasis. *J Cutan Pathol* 2006;33:788-92.
76. Jensen AO, Svaerke C, Farkas D, Pedersen L, Kragballe K, Sorensen HT. Skin cancer risk among solid organ recipients: a nationwide cohort study in Denmark. *Acta Derm Venereol* 2010;90:474-9.
77. DiGiovanna JJ. Retinoid chemoprevention in patients at high risk for skin cancer. *Med Pediatr Oncol* 2001;36:564-7.
78. Bath-Hextall F, Leonardi-Bee J, Somchand N, Webster A, Delitt J, Perkins W. Interventions for preventing non-melanoma skin cancers in high-risk groups. *Cochrane Database Syst Rev* 2007:CD005414.
79. Han J, Colditz GA, Liu JS, Hunter DJ. Genetic variation in XPD, sun exposure, and risk of skin cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14:1539-44.
80. Opara KO, Jiburum BC. Skin cancers in albinos in a teaching Hospital in eastern Nigeria - presentation and challenges of care. *World J Surg Oncol* 2010;8:73.
81. Thompson SC, Jolley D, Marks R. Reduction of solar keratoses by regular sunscreen use. *N Engl J Med* 1993;329:1147-51.
82. Ulrich C, Jurgensen JS, Degen A, et al. Prevention of non-melanoma skin cancer in organ transplant patients by regular use of a sunscreen: a 24 months, prospective, case-control study. *Br J Dermatol* 2009;161 Suppl 3:78-84.
83. van der Pols JC, Williams GM, Pandeya N, Logan V, Green AC. Prolonged prevention of squamous cell carcinoma of the skin by regular sunscreen use. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006;15:2546-8.
84. Moloney FJ, Almarzouqi E, O'Kelly P, Conlon P, Murphy GM. Sunscreen use before and after transplantation and assessment of risk factors associated with skin cancer development in renal transplant recipients. *Arch Dermatol* 2005;141:978-82.
85. van der Pols JC, Xu C, Boyle GM, Parsons PG, Whiteman DC, Green AC. Expression of p53 tumor suppressor protein in sun-exposed skin and associations with sunscreen use and time spent outdoors: a community-based study. *Am J Epidemiol* 2006;163:982-8.
86. Matsui MS, Hsia A, Miller JD, et al. Non-sunscreen photoprotection: antioxidants add value to a sunscreen. *J Investig Dermatol Symp Proc* 2009;14:56-9.
87. Morabito K, Shapley NC, Steeley KG, Tripathi A. Review of sunscreen and the emergence of non-conventional absorbers and their applications in ultraviolet protection. *Int J Cosmet Sci* 2011;33:385-90.
88. Bouknight P, Bowling A, Kovach FE. Sunscreen use for skin cancer prevention. *Am Fam Physician* 2010;82:989-90.
89. Jungman E, Maibach HI. Enhancing sunscreen efficacy in the 'real' world? *J Dermatolog Treat* 2010;21:261-6.
90. Butler GJ, Neale R, Green AC, Pandeya N, Whiteman DC. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and the risk of actinic keratoses and squamous cell cancers of the skin. *J Am Acad Dermatol* 2005;53:966-72.
91. Torti DC, Christensen BC, Storm CA, et al. Analgesic and nonsteroidal anti-inflammatory use in relation to nonmelanoma skin cancer: a population-based case-control study. *J Am Acad Dermatol* 2011;65:304-12.
92. Rivers JK, McLean DI. An open study to assess the efficacy and safety of topical 3% diclofenac in a 2.5% hyaluronic acid gel for the treatment of actinic keratoses. *Arch Dermatol* 1997;133:1239-42.
93. Wolf JE, Jr., Taylor JR, Tschen E, Kang S. Topical 3.0% diclofenac in 2.5% hyaluronan gel in the treatment of actinic keratoses. *Int J Dermatol* 2001;40:709-13.
94. Rivers JK, Arlette J, Shear N, Guenther L, Carey W, Poulin Y. Topical treatment of actinic keratoses with 3.0% diclofenac in 2.5% hyaluronan gel. *Br J Dermatol* 2002;146:94-100.
95. Nelson C, Rigel D, Smith S, Swanson N, Wolf J. Phase IV, open-label assessment of the treatment of actinic keratosis with 3.0% diclofenac sodium topical gel (Solaraze). *J Drugs Dermatol* 2004;3:401-7.
96. Smith SR, Morhenn VB, Piacquadio DJ. Bilateral comparison of the efficacy and tolerability of 3% diclofenac sodium gel and 5% 5-fluorouracil cream in the treatment of actinic keratoses of the face and scalp. *J Drugs Dermatol* 2006;5:156-9.
97. Fariba I, Ali A, Hossein SA, Atefeh S, Atarzadeh Behbahan SA. Efficacy of 3% diclofenac gel for the treatment of actinic keratoses: a randomized, double-blind, placebo controlled study. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 2006;72:346-9.

98. Ulrich C, Hackethal M, Ulrich M, et al. Treatment of multiple actinic keratoses with topical diclofenac 3% gel in organ transplant recipients: a series of six cases. *Br J Dermatol* 2007;156 Suppl 3:40-2.
99. Mastrolonardo M. Topical diclofenac 3% gel plus cryotherapy for treatment of multiple and recurrent actinic keratoses. *Clin Exp Allergy* 2009;34:33-5.
100. Berlin JM, Rigel DS. Diclofenac sodium 3% gel in the treatment of actinic keratoses postcryosurgery. *J Drugs Dermatol* 2008;7:669-73.
101. Dirschka T, Bierhoff E, Pflugfelder A, Garbe C. Topical 3.0% diclofenac in 2.5% hyaluronic acid gel induces regression of cancerous transformation in actinic keratoses. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2010;24:258-63.
102. Stritt A, Merk HF, Braathen LR, von Felbert V. Photodynamic therapy in the treatment of actinic keratosis. *Photochem Photobiol* 2008;84:388-98.
103. Ericson MB, Wennberg AM, Larko O. Review of photodynamic therapy in actinic keratosis and basal cell carcinoma. *Ther Clin Risk Manag* 2008;4:1-9.
104. Rosen RH, Gupta AK, Tyring SK. Dual mechanism of action of ingenol mebutate gel for topical treatment of actinic keratoses: Rapid lesion necrosis followed by lesion-specific immune response. *J Am Acad Dermatol* 2011;66:486-93.
105. Del Rosso JQ. Current regimens and guideline implications for the treatment of actinic keratosis: proceedings of a clinical roundtable at the 2011 Winter Clinical Dermatology Conference. *Cutis* 2011;88:suppl 1-8.
106. Warino L, Tusa M, Camacho F, Teuschler H, Fleischer AB, Jr., Feldman SR. Frequency and cost of actinic keratosis treatment. *Dermatol Surg* 2006;32:1045-9.
107. Borgonjen RJ, van Everdingen JJ, Bik CM, Tuut MK, Spuls PI, van de Kerkhof PC. Prospective comparison of three guideline development methods for treatment of actinic keratosis. *BMJ Qual Saf* 2011;20:832-41.

5. Terceiro manuscrito

Título: Ácido Acetilsalicílico oral e risco de queratoses actínicas: um estudo caso-controle.

Title: *Oral acetylsalicylic acid and risk of actinic keratosis: a case-control study.*

Autores:

Juliano Vilaverde Schmitt (1) – julivs@gmail.com

Hélio Amante Miot (1) – heliomiot@fmb.unesp.br

1. Departamento de Dermatologia e Radioterapia da Faculdade de Medicina de Botucatu, Unesp, Campus de Rubião Jr, Botucatu, SP, Brasil.

Autor correspondente:

Juliano Vilaverde Schmitt

Rua Estados Unidos, 1454 / 1202, Bairro Bacacheri, Curitiba-PR

CEP: 82510-050

julivs@gmail.com

Resumo:

Fundamentos: Queratoses actínicas são proliferações atípicas de queratinócitos com potencial de transformação em carcinoma espinocelular invasivo. Estudos clínicos e laboratoriais verificaram efeito preventivo do ácido acetilsalicílico e outros anti-inflamatórios não hormonais no desenvolvimento de várias neoplasias.

Objetivos: Investigar a influência do uso oral regular de ácido acetilsalicílico na prevalência de queratoses actínicas.

Métodos: Estudo tipo caso-controle com pacientes do ambulatório de dermatologia, maiores de 50 anos, sem evidência de imunocomprometimento, avaliados no período de 2009 a 2011. Os casos foram definidos como aqueles que estavam em uso regular de ácido acetilsalicílico oral, por mais de seis meses consecutivos. Avaliaram-se: idade, gênero, fototipo, tabagismo, uso de medicamentos, ocorrência de câncer de pele pessoal ou familiar, hábitos de fotoproteção e exposição solar. Foram contadas queratoses

actínicas na região medial da face e nos membros superiores. As contagens foram ajustadas pelas covariáveis a partir de modelo linear generalizado (Binomial negativo).

Resultados: Foram avaliados 74 casos e 216 controles. O tempo mediano de uso de ácido acetilsalicílico foi de 36 meses. Casos diferiram dos controles quanto à idade mais elevada, maior prevalência do uso de inibidores da enzima conversora da angiotensina, maior prática de lazer exposto ao sol e menor número de queratoses faciais e dos membros superiores ($p < 0,05$). O modelo multivariado evidenciou que uso de ácido acetilsalicílico associou-se a menores contagens de queratoses actínicas faciais (eritematosas e hipertróficas) e eritematosas dos membros superiores ($p < 0,05$), independentemente dos demais fatores de risco.

Conclusões: O uso regular de ácido acetilsalicílico oral, por mais de seis meses, associou-se à menor prevalência de queratoses actínicas, especialmente as faciais e eritematosas.

Palavras-chave: Ceratose actínica, Apoptose, Epidemiologia, Raios Ultravioleta, Neoplasias, Carcinoma de Células Escamosas; Ácido acetilsalicílico, Estudos de Casos e Controles

Abstract

Background: Actinic keratoses are atypical proliferations of keratinocytes with a potential for turning into invasive squamous cell carcinoma. Clinical and laboratorial studies have observed a preventive effect of acetylsalicylic acid and other non-hormonal anti-inflammatory drugs in the development of many neoplasms.

Objectives: To investigate the influence of a regular oral use of acetylsalicylic acid in the prevalence of actinic keratoses.

Method: A case-control study with outpatients of a dermatologic clinic, above 50 years of age, with no evidence of immunosuppression and assessed between 2009 and 2011. Cases were defined as those who had been under regular use of oral acetylsalicylic acid for more than six consecutive months. The assessment focused on: age, sex, skin-type, tobacco smoking, use of medication, occurrence of individual or family skin cancer, sunscreen and sun exposure habits. Actinic keratoses were counted in the medial region of the face and upper limbs. Counts were adjusted by co-variables by a generalized linear model (negative binomial).

Results: A total of 74 cases and 216 controls were assessed. The median time of aspirin

use was 36 months. Cases differed from controls as to the highest age, highest prevalence of use of angiotensin-converting enzyme inhibitors, more frequent practice of sun-exposed leisure activities, and fewer keratoses on the face and on the upper limbs ($p>0.05$). The multivariate model showed that the use of acetylsalicylic acid was associated to lower counts of face actinic keratoses (erythematous and hypertrophic) and upper-limb erythema ($p>0.05$), regardless of other risk factors.

Conclusions: The regular use of oral acetylsalicylic acid for more than six months was associated to a lower prevalence of actinic keratoses, especially facial and erythematous ones.

Key-words: Actinic keratosis; Apoptosis; Epidemiology; Ultraviolet rays; Neoplasms; Carcinoma, Squamous cell; Acetylsalicylic acid, Case-Control Studies.

Introdução

Queratoses actínicas (QAs) são proliferações atípicas de queratinócitos induzidas principalmente pela radiação ultravioleta (RUV). Além do potencial (5-20%) de transformação como neoplasia invasiva, refletem o fotodano acumulado e indicam maior risco de desenvolvimento de cânceres de pele em toda região acometida pela doença.¹⁻⁵

São frequentes em áreas fotoexpostas da população idosa de pele clara, representando 5,1% das queixas em consultas dermatológicas no Brasil. Na Austrália, estima-se que 40-50% da população acima dos 40 anos apresente ao menos uma lesão.^{6,7}

Considerando-se que QAs possam representar modelos de estudo de carcinogênese cutânea “*in vivo*”, a identificação de fatores que possam prevenir QAs se reflete em potenciais medidas preventivas ou terapêuticas relacionadas ao câncer de pele, especialmente o carcinoma espinocelular (CEC).⁸

Há décadas, estuda-se o papel dos anti-inflamatórios não-hormonais (AINHs), e principalmente do ácido acetilsalicílico (AAS), na prevenção de alguns tipos de câncer, especialmente cânceres de cólon e cutâneos.⁹⁻¹¹ Os resultados favoráveis em estudos experimentais e ensaios clínicos foram atribuídos principalmente à inibição da enzima ciclooxigenase tipo 2 (COX-2), que exerce papel antiapoptótico, angiogênico e proliferativo nessas neoplasias.^{12,13}

Aspirina[®] ou AAS é uma medicação antiga e de baixo custo utilizada como antitérmico e anti-inflamatório que atua pela inibição irreversível das ciclooxigenases 1 e 2.

No entanto, vem sendo indicada em baixas doses na prevenção de eventos tromboembólicos. Estudos clínicos realizados nestas populações indicaram redução na incidência de algumas neoplasias, o que alertou para novas possibilidades terapêuticas. Além do bloqueio da COX-2, acredita-se que outras atividades farmacodinâmicas do AAS possam compor seu efeito antineoplásico.⁸

Os autores objetivam investigar a influência do uso oral regular de AAS na prevalência de QAs em adultos, imunocompetentes, acima dos 50 anos de idade.

Casuística e Métodos

Estudo tipo caso-controle, envolvendo indivíduos adultos maiores de 50 anos, voluntários, esclarecidos e concordantes, de ambos os gêneros, selecionados entre pacientes do ambulatório de dermatologia geral da Fundação Pró-Hansen, Curitiba-PR, no período de abril de 2009 a setembro de 2011.

Os casos foram definidos como aqueles que usaram um mínimo diário de 80mg de AAS oral, em mais de quatro dias por semana, por mais de seis meses consecutivos. Os controles foram aqueles que não referiram uso prévio de AAS.

Foram excluídos pacientes com indícios de imunossupressão, portadores de síndromes genéticas predisponentes a neoplasias, com déficit de comunicação, acamados, com dermatoses difusas no tegumento, fototipos V ou VI, que fizeram uso de outros AINHS regularmente, que interromperam o uso de AAS há mais de dois meses da entrevista, que usaram retinoides tópicos, sistêmicos ou medicações imunossupressoras; que trataram QAs em algum momento ou que se submeteram a tratamentos fototerápicos e radioterápicos prévios.

Não foi adotada sistematização específica da coleta da amostra (amostra por conveniência), ou proporção entre casos e controles, sendo incluídos consecutivamente todos os pacientes disponíveis que apresentassem critérios de inclusão.

A partir de formulário padronizado (Quadro 1) os pacientes foram entrevistados e examinados por dermatologista experiente (J.V.S.), após assinatura de termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 4).

Foram contadas as lesões de QAs visíveis de região predefinida na face, centralmente, e, nos antebraços, abrangendo dos cotovelos até o dorso das mãos (Figura 1). Foi empregada caneta marcadora de pele para auxílio na contagem.¹⁴

Quadro 1. Formulário padronizado utilizado na entrevista.

		Tipo de Registro:		Controle	Caso	Excluído	
Hoje:/...../.....	Iniciais:	Prontuário:	Sexo:	1. M	2. F		
Ano de Nascimento (<1949):	Fototipo:		1	2	3	4 5 6	
Telefone de Contato: ..	Cidade:	1. Curitiba	2. Outra.....				
Radioterapia para câncer?	<input checked="" type="checkbox"/> Sim	Tratamento com fototerapia?	<input checked="" type="checkbox"/> Sim	Acamado?	<input checked="" type="checkbox"/> Sim		
Tomou retinóide?	<input checked="" type="checkbox"/> Sim	Inconsciente?	<input checked="" type="checkbox"/> Sim	Imunossuprimido?	<input checked="" type="checkbox"/> Sim	Não concorda?	<input checked="" type="checkbox"/> Sim
Tratou QA na Dermato?	<input checked="" type="checkbox"/> Sim	Usa AAS <4x/semana?	<input checked="" type="checkbox"/> Sim	Usa AINH regularmente?	<input checked="" type="checkbox"/> Sim		
Usa medicamentos orais:	1. Não	2. Sim	Qual (is):				
Cremes que usou:			Retinóide tópico	5-FU			
Comorbidades?	1. Não	2. Sim	Qual (is):				
Utilizou AAS (>4x/sem) nos último ano :	1. Não	2. Sim					
Mês/ano de início:...../.....	Já parou:	1. Não	<input checked="" type="checkbox"/> 2. Sim	Quando:			
Qual a dose diária de AAS:	Quantos dias por semana?						
Queimadura solar prévia?	1. Não	2. Sim					
História Pessoal de câncer de pele:	1. Não	2. Sim	Qual?:				
História Familiar de câncer de pele (pais, irmãos, filhos, tios):	1. Não	2. Sim					
Profissão / Atividade:	1. Protegido (<i>Indoor</i>)	2. Exposto ao sol		Qual?:			
Há quantos anos?.....							
Profissão prévia:.....							
Atividade Lazer:	1. Protegido (<i>Indoor</i>)	2. Exposto ao sol		Qual?:			
Há quantos anos?.....							
Lazer prévio:							
Usa Filtro solar (há > 2 anos):	1. Nunca	2. todo dia	3. só ao sair de casa	4. só praia/piscina			
Fumou >4x/sem?	1. Não	2. Sim	AINDA FUMA?		3. Sim	4. Não	
Há quantos anos parou?.....	Com que idade começou?.....						
Quantos cigarros por dia?.....	Chegou a fumar quantos?						
Número de QA na FACE:	Eritematosa	Hipertrófica					
Número de QA no MSD:	Eritematosa	Hipertrófica					
Número de QA no MSE:	Eritematosa	Hipertrófica					

As principais variáveis analisadas foram o número e tipo de QAs (eritematosas ou hipertróficas) presentes nas áreas padronizadas na face e membros superiores (MMSS), além do uso de AAS oral (tempo e carga acumulada). As demais variáveis independentes foram: idade, sexo, fototipo, tabagismo, uso de inibidores da enzima conversora de angiotensina (IECA), ocorrência de câncer de pele pessoal ou familiar, hábitos de fotoproteção e exposição solar (ocupacional ou lazer).

Variáveis quantitativas foram representadas pelas médias e desvio padrão, ou medianas e quartis (1^o e 3^o) quando a normalidade não for evidenciada pelo teste de Shapiro-Wilk.¹⁵ A comparação entre grupos foi realizada pelo teste t de Student ou Mann-Whitney, se indicado. Variáveis quantitativas do tipo contagem foram comparadas por modelo de regressão binomial negativo.¹⁶ Variáveis qualitativas foram representadas pelos seus percentuais e comparadas pelos testes do qui-quadrado ou qui-quadrado de

tendência, se houvesse característica ordinal. A correlação entre variáveis quantitativas foi estimada pelo coeficiente de correlação linear de Spearman (r_s).¹⁷

Inicialmente, casos e controles foram comparados bivariadamente a fim de evidenciar a homogeneidade dos grupos. A dimensão do efeito das variáveis categóricas foi estimada pela razão de chances (*Odds Ratio* - *OR*) e seu intervalo de confiança de 95% (IC 95%).¹⁸

Posteriormente, foi desenvolvido um modelo exploratório de risco de QAs a partir de modelo de contagem linear generalizado (Binomial negativo), composto pelas covariáveis que atingissem $p < 0,3$. A dimensão do efeito foi representada pelo estimador β da regressão.¹⁹

Dados faltantes foram estimados por técnica de imputação múltipla.²⁰

Foram considerados significativos valores bicaudais de $p < 0,05$.

Os dados foram tabulados em MS Excel 2003® e analisados usando os softwares SPSS 17.0.²¹

O dimensionamento amostral baseou-se em um pré-teste com 50 casos e 50 controles e calculado para um modelo de regressão múltipla, estimado seu “power” de 0,8 e nível alfa bilateral de 0,05. De acordo com a estimativa de variáveis no modelo final, foi avaliado em 70 casos e 70 controles a amostra mínima.^{22,23}

O projeto foi aprovado pelo comitê de ética e pesquisa do Hospital de Clínicas de Curitiba-PR (Nº 299.EXT.005/2009-03) (Anexo 3).

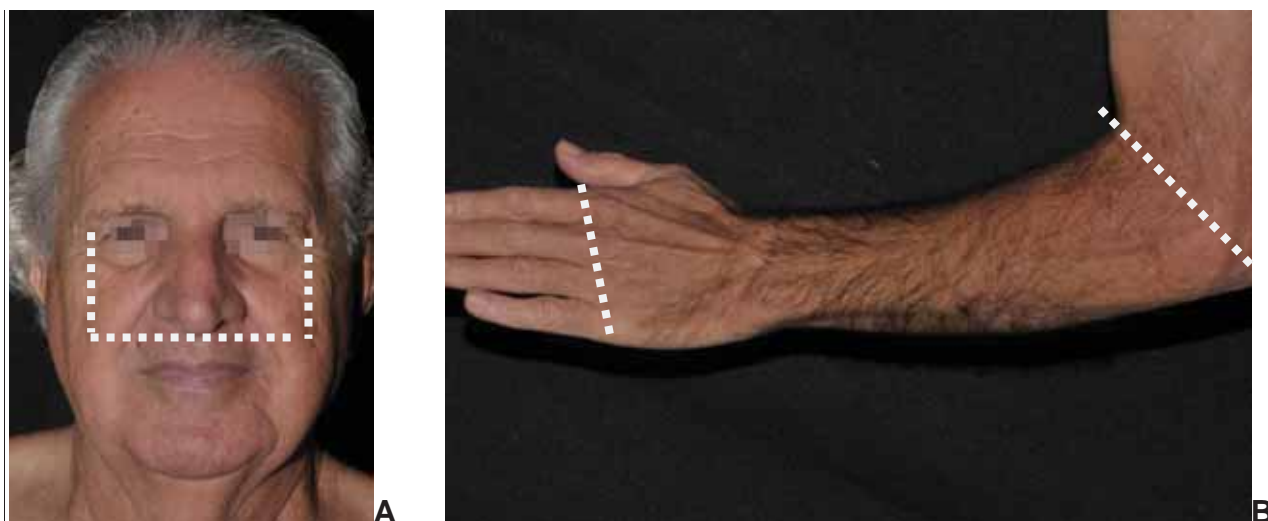


Figura 1. Área padronizada para contagem de QAs faciais (A) e dos antebraços (B)

Resultados

Foram avaliados 290 pacientes, sendo 74 usuários regulares de AAS e 216 controles. Os principais dados clínicos e demográficos estão dispostos na tabela 1 e figura 2. Casos e controles não apresentaram homogeneidade quanto à idade, prevalência do uso de IECA e número de QAs faciais eritematosas.

Entre os casos, o tempo mediano (1º. e 3º. quartis) de uso de AAS foi de 36 (17-74) meses, 81% utilizaram a dose diária de 100mg e a dosagem acumulada mediana foi de 27,7 (13-59) g.

A mediana (1º. e 3º. quartis) amostral do número total de QAs foi 2 (1-5) para a face e 1 (0-3) para os MMSS, sendo que 80% dos pacientes apresentavam ao menos uma lesão de QA na face. Observou-se correlação entre o número de lesões e a idade tanto para lesões da face quanto dos MMSS ($r_s = 0,3$ e $0,4$; $p < 0,01$). Da mesma forma, o número de lesões na face se correlacionou com o número de lesões nos MMSS ($r_s = 0,5$; $p < 0,01$). A figura 3 evidencia que as contagens de QAs totais faciais e de MMSS são menores entre os casos ($p < 0,05$).

Dezoito por cento dos entrevistados já receberam o diagnóstico de câncer de pele alguma vez, sendo que estes apresentavam maior contagem mediana (quartis 1 e 3) de QAs tanto na face quanto em MMSS (4 (2-7) x 2 (1-5); $p < 0,01$ e 2 (0-10) x 0 (0-2); $p < 0,01$).

Os usuários de AAS regulares eram mais velhos e executavam mais atividades de lazer ao ar livre. Houve mais aposentados entre os usuários de AAS (23% x 10%; OR = 2,6 (1,3-5,3); $p < 0,01$), da mesma forma, os praticantes de atividades de lazer ao ar livre eram mais frequentemente aposentados (24% x 9%; OR = 3,3 (1,7-6,5); $p < 0,01$). Quando ajustados por aposentadoria, casos e controles não diferiram em relação à prática de lazer exposto ao sol ($p = 0,20$).

As comorbidades mais significativamente associadas aos usuários regulares de AAS foram cardiopatia isquêmica (18% x 2%; OR = 11,3 (3,6-35,9); $p < 0,01$), hipertensão arterial sistêmica (84% x 39%; OR = 8,12 (4,1-16,0); $p < 0,01$) e diabetes *mellitus* tipo 2 (30% x 6%; OR = 6,6 (3,1-14,0); $p < 0,01$).

A tabela 2 apresenta os coeficientes da regressão das contagens de QAs faciais e dos MMSS. Destaquem-se padrões de variáveis de risco diferentes para cada subtipo da neoplasia, a influência da faixa etária e dos fototipos claros na incidência de QAs em todos os grupos, a redução mais evidente do número de QAs faciais (eritematosas e

hipertróficas) e as eritematosas dos MMSS entre os usuários de AAS, além do tabagismo influenciando fundamentalmente a contagem dos MMSS.

O tempo de uso de AAS e a carga de AAS também se correlacionaram a menores contagens de QAs (eritematosas e hipertróficas) faciais e dos MMSS ($p < 0,05$).

Tabela 1. Principais dados clínicos e demográficos de casos e controles.

Variáveis	Casos	Controles	OR (IC 95%)	p ^a
Gênero Feminino – N(%)	47 (64)	149 (69)	0,78 (0,5-1,4)	0,39 ^b
Idade – mediana (Q1-Q3)	63,5 (58-70)	59 (55-66)	-	0,00 ^c
Fototipo – N(%)				0,41 ^d
I-II	20 (27)	44 (20)	1,40 (0,7-2,8)	
III	30 (41)	98 (45)	0,94 (0,5-1,8)	
IV	24 (32)	74 (34)	1,0	
História de queimadura solar – N(%)	44 (59)	141 (65)	0,78 (0,5-1,3)	0,37 ^b
História pessoal de câncer de pele – N(%)	11 (15)	41 (19)	0,75 (0,4-1,5)	0,43 ^b
História familiar de câncer de pele – N(%)	11 (15)	28 (13)	1,17 (0,6-2,5)	0,68 ^b
Profissão exposta ao sol (últimos 10 anos) – N(%)	13 (18)	35 (16)	1,10 (0,6-2,2)	0,79 ^b
Lazer exposto ao sol – N(%)	30 (41)	63 (29)	1,66 (1,0-2,9)	0,07 ^b
Uso diário filtro solar por mais de 2 anos – N(%)	10 (14)	46 (21)	0,58 (0,3-1,2)	0,14 ^b
Uso regular de IECA – N(%)	35 (47)	39 (18)	4,07 (2,3-7,2)	0,00 ^b
Tabagismo atual – N(%)	10 (14)	41 (19)	0,67 (0,3-1,4)	0,29 ^b
QAs face – Mediana (Q1-Q3)	1 (0-4)	3 (1-6)	-	0,02 ^e
QAs face eritematosa	1 (0-4)	3 (1-5)	-	0,01 ^e
QAs face hipertrófica	0 (0-0)	0 (0-0)	-	0,59 ^e
QAs MMSS – Mediana (Q1-Q3)	0 (0-3)	1 (0-3)	-	0,03 ^e
QAs MMSS eritematosa	0 (0-3)	1 (0-3)	-	0,02 ^e
QAs MMSS hipertrófica	0 (0-0)	0 (0-0)	-	0,72 ^e

^a Valores não ajustados; ^b Teste do qui-quadrado; ^c teste de Mann-Whitney; ^d Teste do qui-quadrado de tendência; ^e Regressão binomial negativa

OR = Razão de chances (*Odds Ratio*); IC 95% = intervalo de confiança de 95%; Q1-Q3 = primeiro e terceiro quartis; IECA = Inibidor da enzima conversora da angiotensina; QA = Queratose actínica; MMSS = Membros superiores.

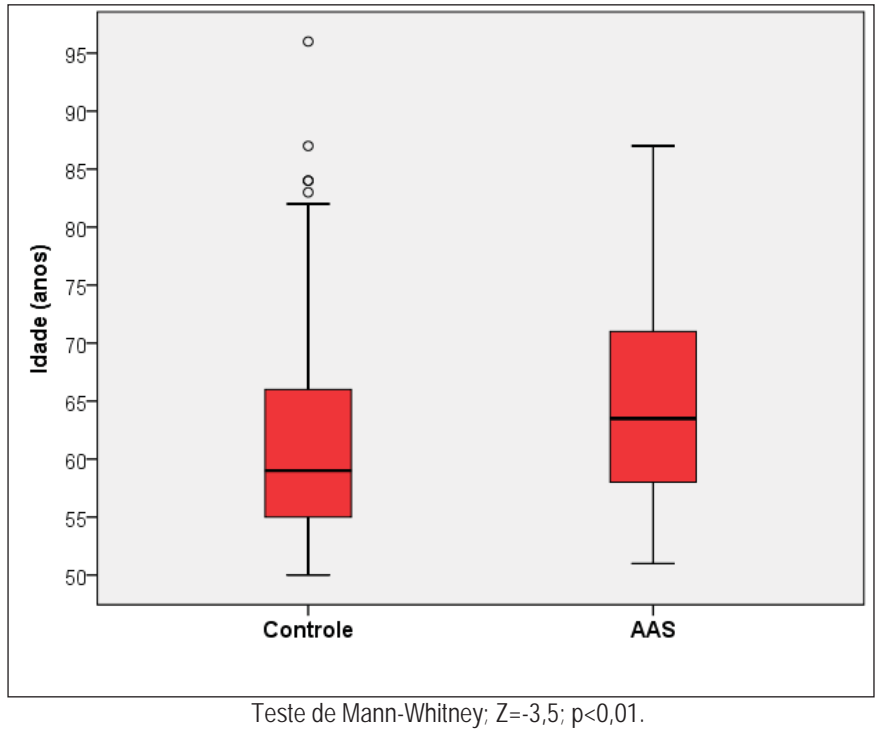


Figura 2. Distribuição das idades dos pacientes em cada grupo.

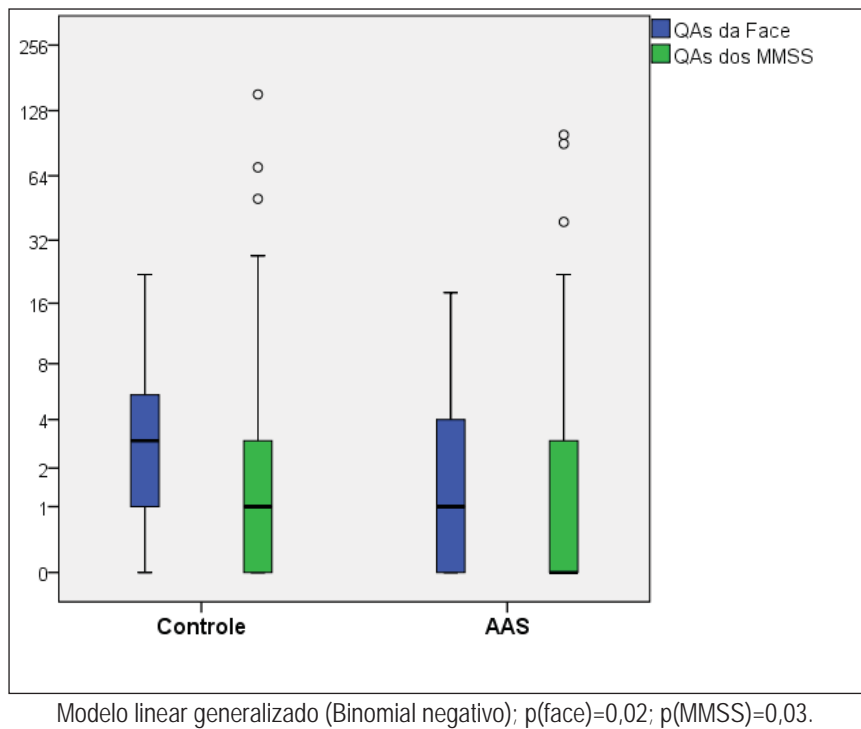


Figura 3. Contagem (escala de Log_2) das QAs faciais e dos membros superiores entre casos e controles.

Tabela 2. Modelo linear generalizado (binomial negativo) para a contagem de QAs ajustado pelas covariáveis de risco.

Variáveis ^a	OAs faciais				OAs MMSS			
	Eritematosa		Hipertrófica		Eritematosa		Hipertrófica	
	estimador	p	estimador β	p	estimador	p	estimador β	p
Uso do AAS	-0,8	0,00	-0,7	0,01	-0,3	0,03	-0,4	0,24
Idade	0,1	0,00	0,1	0,00	0,1	0,00	0,1	0,00
Gênero feminino	-0,2	0,11	-	-	-	-	-	-
Fototipo		0,00		0,00		0,00		0,00
	I-II	1,1		1,7		2,9		2,6
	III	0,6		1,0		1,3		1,6
	IV	0,0		0,0		0,0		0,0
História de queimadura solar	0,3	0,12	1,0	0,01	-	-	-	-
História pessoal de câncer de pele	-	-	0,7	0,16	0,3	0,10	0,5	0,15
História de câncer de pele na família	0,3	0,25	-	-	0,7	0,00	0,8	0,10
Profissão exposta ao sol (nos últimos 10	-	-	-	-	0,4	0,09	0,8	0,03
Lazer exposto ao sol	0,2	0,12	1,1	0,02	-	-	-	-
Uso regular de IECA	-	-	-	-	0,3	0,11	0,5	0,16
Uso diário filtro solar por mais de 2 anos	-	-	-1,9	0,08	-0,6	0,14	-1,1	0,05
Tabagismo atual	-	-	-	-	0,9	0,00	1,4	0,00
Deviance (modelo)	216,7		91,0		336,2		145,8	
p (modelo)	<0,01		<0,01		<0,01		<0,01	

^a Composição de cada modelo com variáveis que resultem em $p < 0,3$; Efeito do modelo: análise tipo I.

IECA = Inibidor da enzima conversora da angiotensina; QA = Queratose actínica; MMSS = Membros superiores.

Discussão

Uso regular de AAS oral associou-se, independentemente, à menor contagem de QAs, especialmente, as formas eritematosas (face e MMSS) e hipertrófica da face. A evidência que o tempo de uso e a carga de uso também foram associados à redução da contagem, o que fortalece a hipótese que AAS possa interferir na gênese de QAs. Uma possível explicação para esse fenômeno é a inibição da COX-2.

Na epiderme normal, apenas uma leve expressão da COX-2 é observada na camada suprabasal, enquanto a COX-1 está presente em toda a epiderme, no entanto, após exposição à RUV, ocorre rápida indução da expressão da COX-2 que exerce efeitos pró-inflamatórios e antiapoptóticos, promovendo resposta inflamatória que exerce papel crítico na carcinogênese.²⁴⁻²⁶

Ocorre aumento da expressão de COX-2 na epiderme murina submetida à radiação UVB, assim como em lesões de QAs, carcinoma espinocelular (CEC) e carcinoma basocelular (CBC).²⁷ Da mesma forma, em humanos,²⁷ há expressão significativamente

elevada de COX-2 em lesões de CEC (40%), doença de Bowen (22%) e QAs (31%) em comparação com a pele normal.^{28,29}

Ratos transgênicos que promovem elevada expressão de COX-2 são mais suscetíveis a tumores cutâneos induzidos pelo UV, enquanto ratos deficientes em COX-2 têm uma taxa de tumores 75% menor que ratos normais.^{30,31} Além disso, se verifica que a presença de QAs inflamadas em humanos está associada à progressão para doença invasiva nestas lesões.³²

A COX-2 e a prostaglandina E2, por ela mediada, são reguladores positivos da proliferação tumoral, principalmente pelas vias Ras/Raf/MAPK e Pt13K/Akt.³³ Por sua vez, a via da MAPK parece induzir a produção de COX-2 gerando um ciclo de retroalimentação positivo.³⁴ Esta mesma via pode ainda ativar a produção de fator de crescimento epitelial (EGF) em tumores colorretais.³⁵

Outra propriedade da COX-2 relacionada a carcinogênese é a promoção da angiogênese tumoral. Sua expressão está correlacionada com a vascularização do tumor, densidade de capilares e síntese de fator de crescimento vascular endotelial.^{29,36} Da mesma forma, em estudos com AINHs em câncer de cólon, verificou-se produção de fatores angiogênicos dependentes da atividade da COX-2.¹³

Além de estimular a proliferação celular e a angiogênese, demonstrou-se que a elevação da COX-2 está relacionada à resistência a apoptose em vários tumores, tais como colorretal, mama, pulmão e próstata. A atividade dessa enzima se mostrou correlacionada com a expressão de proteínas antiapoptóticas da família Bcl2.^{12,13}

Verificou-se decréscimo na formação de tumores de pele induzidos por UV em camundongos que receberam celecoxib (redução de 89%) ou indometacina (redução de 78%).^{37,38} Observou-se também redução de mais de 50% na incidência de tumores de pele induzidos por RUV em ratos nus que receberam nimesulida, um inibidor seletivo da COX-2.³⁹ Adicionalmente, celecoxib inibiu o crescimento de células de melanoma, inclusive em linhagens que não expressavam COX-2.⁴⁰

Entre usuários regulares de AINHs por mais de um ano, mesmo em doses baixas, houve menor risco de CEC (OR=0,2) e menor contagem de QAs (OR=0,5).⁴¹ Resultados semelhantes quanto ao CEC foram encontrados em um estudo populacional com 1484 participantes, verificando redução de risco com vários AINHs, principalmente o AAS, e mais intensamente para tumores positivos para p53 ou com perda de heterozigose do gene do PTCH.¹⁰

Clouser e cols. também identificaram em um estudo prospectivo observacional, que envolveu 2297 participantes, associação inversa entre o uso de AINHs e risco de CEC e CBC, porém, neste estudo, o uso em curto prazo foi mais protetor que o uso em longo prazo.⁴² Ainda, Asgari e cols. não verificaram associação entre o uso de AINHs e risco de CEC em uma investigação que incluiu 830 norte americanos.⁴³

O efeito terapêutico do uso tópico de AINHs em QAs já foi significativamente avaliado. Um estudo aberto verificou significativa redução nas QAs pelo uso tópico de gel de diclofenaco de sódio, um potente inibidor da COX-1 e 2, resultando em 81% de resposta completa.⁴⁴ Diversos estudos subsequentes corroboraram este achado.⁴⁵⁻⁵³

O uso oral de celecoxib, um inibidor seletivo da COX-2, foi avaliado prospectivamente em um estudo com 240 indivíduos para a prevenção de CEC e CBC em portadores de 10 a 40 QAs. Após nove meses de seguimento ocorreram significativamente menos novas lesões de CEC (Risco relativo - RR=0,4) e CBC (RR=0,4) nos usuários de celecoxib, porém, não houve redução no número de QAs.⁵⁴ Coincidentemente, um estudo prospectivo, controlado e duplo-cego verificou 20% menos novas lesões de CBC em portadores da síndrome do nevo basocelular após três anos de uso de celecoxib.⁵⁵

Além dos tumores queratinocíticos, observou-se também menor risco de desenvolvimento de melanoma cutâneo em usuárias regulares de AINHs (RR=0,5), mas não em homens.⁵⁶ Este achado foi confirmado em dois estudos posteriores (OR=0,5),^{11,57} porém, uma coorte envolvendo 63.809 participantes não verificou tal associação.⁵⁸

Apesar da inibição da COX-2 pelo AAS ocorrer em uma proporção dose-dependente, o uso oral de apenas 81mg diário reduz significativamente os níveis de prostaglandina E2 na mucosa colônica distal, justificando o efeito clínico sob baixas doses, como aconteceu em nossa amostra.⁵⁹ Além disso, já foram propostos mecanismos antineoplásicos independentes da COX-2 para o AAS, tais como a ativação do fator nuclear kappa beta (NF- κ B) e o estímulo à expressão de proteínas de reparo do DNA como: hMLH1 e hPMS2.⁶⁰⁻⁶²

Em nosso estudo, os grupos foram bastante semelhantes quanto às variáveis estudadas, exceto quanto à idade, prevalência de comorbidades, frequência de uso de IECA e maior relato de atividades de lazer ao ar livre entre os casos. Tais características eram previsíveis pelo fato que a indicação de AAS pressupõe doenças cardiovasculares, que são mais prevalentes com o envelhecimento. Da mesma forma, casos apresentaram maior tempo livre para o lazer pelo fato de que grande parte ser aposentada e pode ser

estimulada à prática de atividades físicas ao ar livre, como caminhadas, por motivos terapêuticos e preventivos.

Em contrapartida, maior atividade de lazer exposta ao sol e maior idade deveriam ser fatores que elevassem a incidência de QAs entre os casos. A menor contagem de lesões nesses pacientes reforça a evidência que AAS exerça papel protetor no desenvolvimento de QAs.

Alguns estudos epidemiológicos identificaram um possível efeito antineoplásico dos IECA.^{63,64} Tais efeitos seriam atribuídos a redução nas atividades angiogênica e promotora de crescimento tumoral da angiotensina II. Christian e cols. verificaram efeito preventivo do IECA sobre lesões de CEC (RR = 0,7) e CBC (RR = 0,6), no entanto, os pesquisadores não controlaram os efeitos pelo uso de AAS ou outros AINHs, além disso, as QAs só foram contadas no início daquele estudo e analisadas como variável de ajuste.⁶³ Em nossa casuística, verificou-se significativa associação entre o uso de AAS e de IECA, pois são medicações frequentemente indicadas para doenças cardiovasculares. Apesar disso, o uso de AAS pareceu associar-se a menor contagem de lesões de QA na face, mesmo quando ajustado pelo uso de IECA. Na análise dos fatores de risco para QAs, o uso de IECA, na forma que foi contabilizado, não se associou ao número de QAs.

A prevalência de QA foi elevada nesta amostra (83,1%), sendo mais numerosa proporcionalmente à idade, aos fototipos baixos e associada à ocorrência de câncer de pele. Tais achados corroboram observações epidemiológicas prévias e aludem ao provável aumento da incidência de QAs com o prolongamento da longevidade da população e aumento das suas atividades de lazer expostas diretamente ao sol, tornando ainda mais premente, a investigação de elementos que venham a prevenir QA e sua transformação para CEC.^{2,7}

As variações na prevalência de QAs observadas nos diferentes estudos epidemiológicos podem dever-se à composição étnica da população, hábitos de fotoproteção e fotoexposição, aos níveis de radiação ultravioleta a qual ela está submetida assim como a metodologia de contagem utilizada por cada equipe. Na região estudada, localizada no paralelo 25-Sul, a população é composta majoritariamente por descendentes europeus. Além disso, a metodologia utilizada promoveu a busca ativa de lesões, mesmo que clinicamente não significativas, em uma população específica, constituída de pacientes dermatológicos em geral, contribuindo para a alta prevalência de QAs na amostra.

Tabagismo é fator de risco reconhecido para diversos tumores sólidos, além de

atuar como cofator em outras neoplasias, por exemplo, no caso dos tumores relacionados ao papilomavirus.^{65,66} Há alguns estudos que relacionam o câncer de pele ao fumo, especialmente o CEC (RR = 2,0).⁶⁷⁻⁶⁹ Além disso, há forte associação entre tabagismo e queratoacantoma solitário (OR = 9,1), que alguns autores consideram como uma forma de CEC bem diferenciado.^{70,71}

Nossos dados mostraram associação entre tabagismo atual e o número de lesões de QA nos MMSS, mas não na face. Uma explicação para isso seria a de que na região de origem dos pacientes, situada a aproximadamente 1000 metros de altitude, com clima frio a maior parte do ano, ocorre maior proteção solar dos MMSS devido ao vestuário, que na face, permitindo a atuação local predominante de outros carcinógenos que não a RUV. Esse achado deve ser elucidado em estudos com desenhos próprios.

Além de padrões diferentes das QAs da face e dos MMSS, que podem ser justificados pela dificuldade de quantificação da fotoexposição e fotoproteção, identificamos diferenças nos perfis de risco para QAs hipertróficas e eritematosas. Isso pode decorrer da distribuição de lesões hipertróficas, mais comumente localizadas nos MMSS, assim como ocorrerem em menor amplitude de contagem que as eritematosas, reduzindo o desempenho exploratório dos modelos estatísticos. No entanto, é possível também que QAs hipertróficas apresentem menor resposta ao AAS, ou ainda que representem maior risco de evoluírem ou até já apresentarem caráter invasivo, podendo se encontrar em estágios mais avançados da carcinogênese.⁷² Estes dados sugerem que estudos de fatores de risco e mesmo ensaios clínicos em QAs devem considerar a localização das lesões e os tipos clínicos na análise dos resultados obtidos.

Foi identificada associação negativa entre o uso regular por mais de dois anos de filtro solar e as lesões de QA, principalmente as hipertróficas, o que reforça a importância da fotoexposição na gênese das QAs. O efeito preventivo e terapêutico do uso de filtro solar sobre QAs já fora relatado previamente (OR=1,5 para remissão e RR = 0,6 para incidência), principalmente em locais e períodos do ano com elevados índices de RUV.⁷³⁻⁷⁵

Nosso estudo apresenta algumas limitações decorrentes da possível imprecisão do diagnóstico clínico das QAs, além do que, a contagem manual das lesões apresenta reprodutibilidade variável.^{14,76} Apesar disso, nossos resultados mostraram-se coerentes com os dados da literatura e com a fisiopatologia das lesões. A quantificação diferencial entre QAs eritematosas e hipertróficas também revelou elementos que favorecem a abordagem por subgrupos ao invés de contagens totais de lesões utilizadas por outros

autores, principalmente enquanto não se conhece a história natural e evolutiva da gênese e transformação entre esses subtipos.

Como nosso estudo foi realizado entre pacientes dermatológicos de instituição pública do Sul do Brasil, não podemos extrapolar seus resultados para outras realidades. No entanto, a associação entre o uso de AINHS e QAs já foi verificada em populações distintas, a consistência entre os resultados das análises e a magnitude dos efeitos encontrados favorecem o reconhecimento da associação entre o uso de AAS e menores contagens de QAs.⁴¹ Além disso, os rígidos critérios de exclusão e emprego de variáveis de controle reduziram o efeito de vieses de seleção.

Ensaio clínico posteriores com amostragem representativa devem substanciar nossos achados, e definir o papel do uso regular de AAS e outros AINHS na prevenção de QAs.

Conclusões

QAs são associadas à idade elevada e fototipos mais claros. O uso regular de AAS oral, por mais de seis meses, associou-se à menor prevalência de QAs, especialmente as faciais e as eritematosas nos MMSS, o que corrobora resultados de estudos prévios quanto ao potencial efeito antineoplásico cutâneo do AAS.

Referências

1. Ulrich C. Topical treatment of field cancerization. *Cancer Treat Res* 2009;146:439-46.
2. Salasche SJ. Epidemiology of actinic keratoses and squamous cell carcinoma. *J Am Acad Dermatol* 2000;42:4-7.
3. Lebwohl M. Actinic keratosis: epidemiology and progression to squamous cell carcinoma. *Br J Dermatol* 2003;149 Suppl 66:31-3.
4. Rossi R, Mori M, Lotti T. Actinic keratosis. *Int J Dermatol* 2007;46:895-904.
5. Chia A, Moreno G, Lim A, Shumack S. Actinic keratoses. *Aust Fam Physician* 2007;36:539-43.
6. Frost CA, Green AC. Epidemiology of solar keratoses. *Br J Dermatol* 1994;131:455-64.
7. Sociedade Brasileira de Dermatologia SBD. Perfil nosológico das consultas dermatológicas no Brasil. *An Bras Dermatol* 2006;81:549-58.
8. Langley RE, Burdett S, Tierney JF, Cafferty F, Parmar MK, Venning G. Aspirin and cancer: has aspirin been overlooked as an adjuvant therapy? *Br J Cancer* 2011;105:1107-13.
9. Ruder EH, Laiyemo AO, Graubard BI, Hollenbeck AR, Schatzkin A, Cross AJ. Non-steroidal anti-inflammatory drugs and colorectal cancer risk in a large, prospective cohort. *Am J Gastroenterol* 2011;106:1340-50.
10. Torti DC, Christensen BC, Storm CA, et al. Analgesic and nonsteroidal anti-inflammatory use in relation to nonmelanoma skin cancer: a population-based case-control study. *J Am Acad Dermatol* 2011;65:304-12.
11. Curiel-Lewandrowski C, Nijsten T, Gomez ML, Hollestein LM, Atkins MB, Stern RS. Long-term use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs decreases the risk of cutaneous melanoma: results of a United States case-control study. *J Invest Dermatol* 2011;131:1460-8.
12. Tjiu JW, Liao YH, Lin SJ, et al. Cyclooxygenase-2 overexpression in human basal cell carcinoma cell line increases antiapoptosis, angiogenesis, and tumorigenesis. *J Invest Dermatol* 2006;126:1143-51.

13. Fecker LF, Stockfleth E, Nindl I, Ulrich C, Forschner T, Eberle J. The role of apoptosis in therapy and prophylaxis of epithelial tumours by nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). *Br J Dermatol* 2007;156 Suppl 3:25-33.
14. Epstein E. Quantifying actinic keratosis: assessing the evidence. *Am J Clin Dermatol* 2004;5:141-4.
15. Henderson AR. Testing experimental data for univariate normality. *Clin Chim Acta* 2006;366:112-29.
16. Coxe S, West SG, Aiken LS. The analysis of count data: a gentle introduction to poisson regression and its alternatives. *J Pers Assess* 2009;91:121-36.
17. Norman GR, Streiner DL. *Biostatistics. The bare essentials*. 3rd ed. Shelton, Connecticut: People's Medical Publishing House; 2008.
18. Katz MH. *Multivariable analysis. A practical guide for clinicians*. 2nd ed. Cambridge, UK: Cambridge University Press; 2006.
19. Hughes MC, Williams GM, Fourtanier A, Green AC. Food intake, dietary patterns, and actinic keratoses of the skin: a longitudinal study. *Am J Clin Nutr* 2009;89:1246-55.
20. Mackinnon A. The use and reporting of multiple imputation in medical research - a review. *J Intern Med* 2010;268:586-93.
21. SPSS 17.0 for Windows. In. 17 ed. Chicago (IL): SPSS Incorporation; 2008:Statistical Package for Social Science (SPSS).
22. Ortega Calvo M, Cayuela Dominguez A. [Unconditioned logistic regression and sample size: a bibliographic review]. *Rev Esp Salud Publica* 2002;76:85-93.
23. Demidenko E. Sample size determination for logistic regression revisited. *Stat Med* 2007;26:3385-97.
24. Wang CH, Ouyang Q, Tang CW, Huang MH, Li X. [Effects of selective and non-selective cyclooxygenase-2 inhibitor on the growth of colon cancer cells]. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 2006;37:547-50.
25. Leong J, Hughes-Fulford M, Rakhlin N, Habib A, Maclouf J, Goldyne ME. Cyclooxygenases in human and mouse skin and cultured human keratinocytes: association of COX-2 expression with human keratinocyte differentiation. *Exp Cell Res* 1996;224:79-87.
26. Buckman SY, Gresham A, Hale P, et al. COX-2 expression is induced by UVB exposure in human skin: implications for the development of skin cancer. *Carcinogenesis* 1998;19:723-9.
27. An KP, Athar M, Tang X, et al. Cyclooxygenase-2 expression in murine and human nonmelanoma skin cancers: implications for therapeutic approaches. *Photochem Photobiol* 2002;76:73-80.
28. Wu Y, Liu H, Li J. Expression of p63 and cyclooxygenase-2 and their correlation in skin tumors. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2007;27:206-8.
29. Nijsten T, Colpaert CG, Vermeulen PB, Harris AL, Van Marck E, Lambert J. Cyclooxygenase-2 expression and angiogenesis in squamous cell carcinoma of the skin and its precursors: a paired immunohistochemical study of 35 cases. *Br J Dermatol* 2004;151:837-45.
30. Tiano HF, Loftin CD, Akunda J, et al. Deficiency of either cyclooxygenase (COX)-1 or COX-2 alters epidermal differentiation and reduces mouse skin tumorigenesis. *Cancer Res* 2002;62:3395-401.
31. Muller-Decker K, Neufang G, Berger I, Neumann M, Marks F, Furstenberger G. Transgenic cyclooxygenase-2 overexpression sensitizes mouse skin for carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:12483-8.
32. Berhane T, Halliday GM, Cooke B, Barnetson RS. Inflammation is associated with progression of actinic keratoses to squamous cell carcinomas in humans. *Br J Dermatol* 2002;146:810-5.
33. Sheng H, Shao J, Morrow JD, Beauchamp RD, DuBois RN. Modulation of apoptosis and Bcl-2 expression by prostaglandin E2 in human colon cancer cells. *Cancer Res* 1998;58:362-6.
34. Yano T, Zissel G, Muller-Qernheim J, Jae Shin S, Satoh H, Ichikawa T. Prostaglandin E2 reinforces the activation of Ras signal pathway in lung adenocarcinoma cells via EP3. *FEBS Lett* 2002;518:154-8.
35. Yoshimoto T, Takahashi Y, Kinoshita T, Sakashita T, Inoue H, Tanabe T. Growth stimulation and epidermal growth factor receptor induction in cyclooxygenase-overexpressing human colon carcinoma cells. *Adv Exp Med Biol* 2002;507:403-7.
36. O'Grady A, O'Kelly P, Murphy GM, Leader M, Kay E. COX-2 expression correlates with microvessel density in non-melanoma skin cancer from renal transplant recipients and immunocompetent individuals. *Hum Pathol* 2004;35:1549-55.
37. Fischer SM, Lo HH, Gordon GB, et al. Chemopreventive activity of celecoxib, a specific cyclooxygenase-2 inhibitor, and indomethacin against ultraviolet light-induced skin carcinogenesis. *Mol Carcinog* 1999;25:231-40.
38. Orenge IF, Gerguis J, Phillips R, Guevara A, Lewis AT, Black HS. Celecoxib, a cyclooxygenase 2 inhibitor as a potential chemopreventive to UV-induced skin cancer: a study in the hairless mouse model. *Arch Dermatol* 2002;138:751-5.

39. Tang X, Kim AL, Kopelovich L, Bickers DR, Athar M. Cyclooxygenase-2 inhibitor nimesulide blocks ultraviolet B-induced photocarcinogenesis in SKH-1 hairless mice. *Photochem Photobiol* 2008;84:522-7.
40. Bundscherer A, Hafner C, Maisch T, Becker B, Landthaler M, Vogt T. Antiproliferative and proapoptotic effects of rapamycin and celecoxib in malignant melanoma cell lines. *Oncol Rep* 2008;19:547-53.
41. Butler GJ, Neale R, Green AC, Pandeya N, Whiteman DC. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and the risk of actinic keratoses and squamous cell cancers of the skin. *J Am Acad Dermatol* 2005;53:966-72.
42. Clouser MC, Roe DJ, Foote JA, Harris RB. Effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs on non-melanoma skin cancer incidence in the SKICAP-AK trial. *Pharmacoepidemiol Drug Saf* 2009;18:276-83.
43. Asgari MM, Chren MM, Warton EM, Friedman GD, White E. Association between nonsteroidal anti-inflammatory drug use and cutaneous squamous cell carcinoma. *Arch Dermatol* 2010;146:388-95.
44. Rivers JK, McLean DI. An open study to assess the efficacy and safety of topical 3% diclofenac in a 2.5% hyaluronic acid gel for the treatment of actinic keratoses. *Arch Dermatol* 1997;133:1239-42.
45. Wolf JE, Jr., Taylor JR, Tschen E, Kang S. Topical 3.0% diclofenac in 2.5% hyaluronan gel in the treatment of actinic keratoses. *Int J Dermatol* 2001;40:709-13.
46. Rivers JK, Arlette J, Shear N, Guenther L, Carey W, Poulin Y. Topical treatment of actinic keratoses with 3.0% diclofenac in 2.5% hyaluronan gel. *Br J Dermatol* 2002;146:94-100.
47. Nelson C, Rigel D, Smith S, Swanson N, Wolf J. Phase IV, open-label assessment of the treatment of actinic keratosis with 3.0% diclofenac sodium topical gel (Solaraze). *J Drugs Dermatol* 2004;3:401-7.
48. Smith SR, Morhenn VB, Piacquadio DJ. Bilateral comparison of the efficacy and tolerability of 3% diclofenac sodium gel and 5% 5-fluorouracil cream in the treatment of actinic keratoses of the face and scalp. *J Drugs Dermatol* 2006;5:156-9.
49. Fariba I, Ali A, Hossein SA, Atefeh S, Atarzadeh Behbahan SA. Efficacy of 3% diclofenac gel for the treatment of actinic keratoses: a randomized, double-blind, placebo controlled study. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 2006;72:346-9.
50. Ulrich C, Hackethal M, Ulrich M, et al. Treatment of multiple actinic keratoses with topical diclofenac 3% gel in organ transplant recipients: a series of six cases. *Br J Dermatol* 2007;156 Suppl 3:40-2.
51. Mastrolonardo M. Topical diclofenac 3% gel plus cryotherapy for treatment of multiple and recurrent actinic keratoses. *Clin Exp Allergy* 2009;34:33-5.
52. Berlin JM, Rigel DS. Diclofenac sodium 3% gel in the treatment of actinic keratoses postcryosurgery. *J Drugs Dermatol* 2008;7:669-73.
53. Dirschka T, Bierhoff E, Pflugfelder A, Garbe C. Topical 3.0% diclofenac in 2.5% hyaluronic acid gel induces regression of cancerous transformation in actinic keratoses. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2010;24:258-63.
54. Elmets CA, Viner JL, Pentland AP, et al. Chemoprevention of nonmelanoma skin cancer with celecoxib: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Natl Cancer Inst* 2010;102:1835-44.
55. Tang JY, Aszterbaum M, Athar M, et al. Basal cell carcinoma chemoprevention with nonsteroidal anti-inflammatory drugs in genetically predisposed PTCH1+/- humans and mice. *Cancer Prev Res* 2010;3:25-34.
56. Harris RE, Beebe-Donk J, Namboodiri KK. Inverse association of non-steroidal anti-inflammatory drugs and malignant melanoma among women. *Oncol Rep* 2001;8:655-7.
57. Joosse A, Koomen ER, Casparie MK, Herings RM, Guchelaar HJ, Nijsten T. Non-steroidal anti-inflammatory drugs and melanoma risk: large Dutch population-based case-control study. *J Invest Dermatol* 2009;129:2620-7.
58. Asgari MM, Maruti SS, White E. A large cohort study of nonsteroidal anti-inflammatory drug use and melanoma incidence. *J Natl Cancer Inst* 2008;100:967-71.
59. Krishnan K, Ruffin MT, Normolle D, et al. Colonic mucosal prostaglandin E2 and cyclooxygenase expression before and after low aspirin doses in subjects at high risk or at normal risk for colorectal cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001;10:447-53.
60. Stark LA, Reid K, Sansom OJ, et al. Aspirin activates the NF-kappaB signalling pathway and induces apoptosis in intestinal neoplasia in two in vivo models of human colorectal cancer. *Carcinogenesis* 2007;28:968-76.
61. Goel A, Chang DK, Ricciardiello L, Gasche C, Boland CR. A novel mechanism for aspirin-mediated growth inhibition of human colon cancer cells. *Clin Cancer Res* 2003;9:383-90.
62. Din FV, Stark LA, Dunlop MG. Aspirin-induced nuclear translocation of NFkappaB and apoptosis in colorectal cancer is independent of p53 status and DNA mismatch repair proficiency. *Br J Cancer* 2005;92:1137-43.
63. Christian JB, Lapane KL, Hume AL, Eaton CB, Weinstock MA. Association of ACE inhibitors and angiotensin receptor blockers with keratinocyte cancer prevention in the randomized VATTC trial. *J Natl Cancer Inst* 2008;100:1223-32.

64. Moscarelli L, Zanazzi M, Mancini G, et al. Keratinocyte cancer prevention with ACE inhibitors, angiotensin receptor blockers or their combination in renal transplant recipients. *Clin Nephrol* 2010;73:439-45.
65. Sinha P, Logan HL, Mendenhall WM. Human papillomavirus, smoking, and head and neck cancer. *Am J Otol* 2012;33:130-6.
66. Guarisi R, Sarian LO, Hammes LS, et al. Smoking worsens the prognosis of mild abnormalities in cervical cytology. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2009;88:514-20.
67. De Hertog SA, Wensveen CA, Bastiaens MT, et al. Relation between smoking and skin cancer. *J Clin Oncol* 2001;19:231-8.
68. Sitas F, Yu XQ, O'Connell D, et al. The relationship between basal and squamous cell skin cancer and smoking related cancers. *BMC Res Notes* 2011;4:556.
69. Rollison DE, Iannacone MR, Messina JL, et al. Case-control study of smoking and non-melanoma skin cancer. *Cancer Causes Control* 2011:(ahead of print. DOI: 10.1007/s10552-011-9872-y).
70. Miot HA, Miot LD, da Costa AL, Matsuo CY, Stolf HO, Marques ME. Association between solitary keratoacanthoma and cigarette smoking: a case-control study. *Dermatol Online J* 2006;12:2.
71. Beham A, Regauer S, Soyer HP, Beham-Schmid C. Keratoacanthoma: a clinically distinct variant of well differentiated squamous cell carcinoma. *Adv Anat Pathol* 1998;5:269-80.
72. Quaedvlieg PJ, Tirsi E, Thissen MR, Krekels GA. Actinic keratosis: how to differentiate the good from the bad ones? *Eur J Dermatol* 2006;16:335-9.
73. Thompson SC, Jolley D, Marks R. Reduction of solar keratoses by regular sunscreen use. *N Engl J Med* 1993;329:1147-51.
74. Hensen P, Muller ML, Haschemi R, et al. Predisposing factors of actinic keratosis in a North-West German population. *Eur J Dermatol* 2009;19:345-54.
75. Ulrich C, Jurgensen JS, Degen A, et al. Prevention of non-melanoma skin cancer in organ transplant patients by regular use of a sunscreen: a 24 months, prospective, case-control study. *Br J Dermatol* 2009;161 Suppl 3:78-84.
76. Atkins D, Bang RH, Sternberg MR, Chen SC. Reliable methods to evaluate the burden of actinic keratoses. *J Invest Dermatol* 2006;126:591-4.

6. Conclusões gerais

1. Foram avaliadas e descritas as expressões histológicas de fatores ligados à proliferação, apoptose e inflamação, comparativamente, em queratoses actínicas, epiderme fotoexposta e epiderme fotoprottegida.
 - a. Evidenciou-se correlação da expressão de marcadores de proliferação (Ki-67), resistência a apoptose (p53 e survivina) e inflamação (COX-2) com o grau de displasia do epitélio (NIQ).
 - b. Houve maior expressão dos marcadores de proliferação (Ki-67), resistência a apoptose (p53 e survivina) e inflamação (COX-2) nas queratoses acínicas que na pele fotoprottegida.
 - c. O marcador p105/50 expressou-se mais no epitélio fotoprottegido que nas queratoses actínicas.
 - d. A expressão de fatores antiapoptóticos, de atividade inflamatória e proliferativos na pele fotoexposta indica dano genômico tecidual subclínico e risco de neoplasia subsequente.
2. Foi avaliada e descrita a prevalência de queratoses actínicas em pacientes com mais de 50 anos de idade e a sua relação com a exposição ao ácido acetilsalicílico.
 - a. O uso oral regular de ácido acetilsalicílico associou-se a menores contagens de queratoses actínicas faciais e eritematosas dos membros superiores.
 - b. Queratoses actínicas foram mais numerosas entre os indivíduos com idade elevada, fototipos claros, com profissão ou lazer expostos ao sol, tabagistas, que referem não usar regularmente filtro solar, que sofreram queimaduras solares na juventude e com histórico pessoal ou familiar de câncer de pele.
3. Os resultados corroboram a importância da identificação de fenótipos e comportamentos de risco para queratoses actínicas, evidenciam o dano genômico induzido pela radiação ultravioleta na sua gênese, e indicam que atitudes de prevenção primárias, além de substâncias que interfiram na atividade apoptótica e inflamatória possam evitar ou interferir com o processo de carcinogênese cutânea.

7. Perspectivas

O presente estudo contribui para maior conhecimento dos aspectos epidemiológicos relacionados às QAs e os resultados sugerem a possibilidade de redução do risco de seu desenvolvimento a partir de intervenções em vias de inflamação que interagem com sistemas de apoptose, como a COX-2 e NF- κ B.

Esse trabalho deve ser reproduzido em diferentes populações, de diferentes composições étnicas, sociais, culturais e geográficas, para ratificar os resultados e demonstrar sua validade externa. Além disso, a complementação das evidências deve ser conduzida a partir de ensaios clínicos controlados e randomizados empregando AAS, ou outro AINH, na prevenção de QAs e CECs, especialmente, em grupos de risco.

O estudo detalhado de diferentes componentes de cada via identificada nesse estudo pode, além de substanciar o conhecimento da carcinogênese, indicar estratégias terapêuticas e preventivas inovadoras.

É recente no conhecimento humano que câncer represente doença genética, decorrente de sucessivas mutações somáticas que evoluem clonalmente, aumentando o potencial proliferativo e invasivo de suas células, assim como seu entendimento na perspectiva da evolução das espécies.

A vida surgiu na Terra há 3,7 bilhões de anos e, apenas há 600 milhões de anos, originaram-se os primeiros organismos pluricelulares. Para manter as comunidades de células coesas e interativas, formando corpos eficientes e competitivos evolutivamente, as células precisaram desenvolver mecanismos que controlassem sua proliferação, por vezes inibindo-a ou até desencadeando sua própria morte em detrimento do sucesso de uma estrutura organizacional.

A característica mais almejada pelos organismos vivos é a capacidade de se proliferar eficientemente nos mais diversos ambientes. Com o surgimento dos organismos multicelulares mais complexos, esta característica teve de ser controlada, sob o risco de causar o que hoje chamamos de câncer.

Um dos principais mecanismos que a evolução criou para propiciar o adequado desenvolvimento dos seres pluricelulares complexos e evitar o crescimento desordenado de células é a apoptose, presente desde a fase embrionária e que atua por meio de mecanismos intrínsecos celulares ou extrínsecos, como sinalizadores provenientes do ambiente ou de outras células.

Várias moléculas, genes e mutações já foram identificados em diferentes neoplasias, sendo que a progressão do câncer geralmente se dá através de processos de mutações cumulativas e sequencialmente ordenadas, suplantando os mecanismos de apoptose.

Apesar da natureza aparentemente caótica e aleatória das alterações que levam ao câncer, a evolução progressiva dos tumores invasivos a partir de lesões menos agressivas, ou pré-malignas, evidenciam a ordem que existe por trás deste processo. As lesões de QAs são um exemplo vívido dessa percepção da carcinogênese.

O conhecimento detalhado do processo de carcinogênese, de elementos ambientais, fenotípicos, comportamentais e das vias metabólicas envolvidas nas fases de iniciação, promoção e proliferação neoplásica permitem a elaboração de estratégias de prevenção primária e tratamentos de menor morbidade, preferencialmente, em lesões ainda pré-neoplásicas. A acessibilidade, simplicidade e segurança do exame clínico e da amostragem de tecidos dermatológicos favorecem o estudo da carcinogênese cutânea, em que QAs são modelos de evolução para neoplasia invasiva; e intervenções diretas ao tecido sob risco, genomicamente alterado (campo de cancerização), nas QAs e queilites actínicas podem reduzir a incidência e complicações diretas dos CECs.

O aumento da longevidade da população pressupõe incremento na incidência de neoplasias cutâneas, provavelmente, devido ao dano cumulativo pela exposição à RUV, exposição à carcinógenos ocupacionais, possível impacto da dieta e resistência à insulina, menor capacidade de reversão do dano oxidativo sistêmico, efeito de processos infecciosos e inflamatórios crônicos, menor vigilância imunológica e atividade apoptótica.

Além disso, como a ocorrência de QAs ocorre, especialmente, após a idade reprodutiva, é pouco provável que a pressão seletiva decorrente de seu impacto na qualidade de vida, ou mesmo da mortalidade específica, promova a progressão populacional de grupos mais resistentes à carcinogênese cutânea.

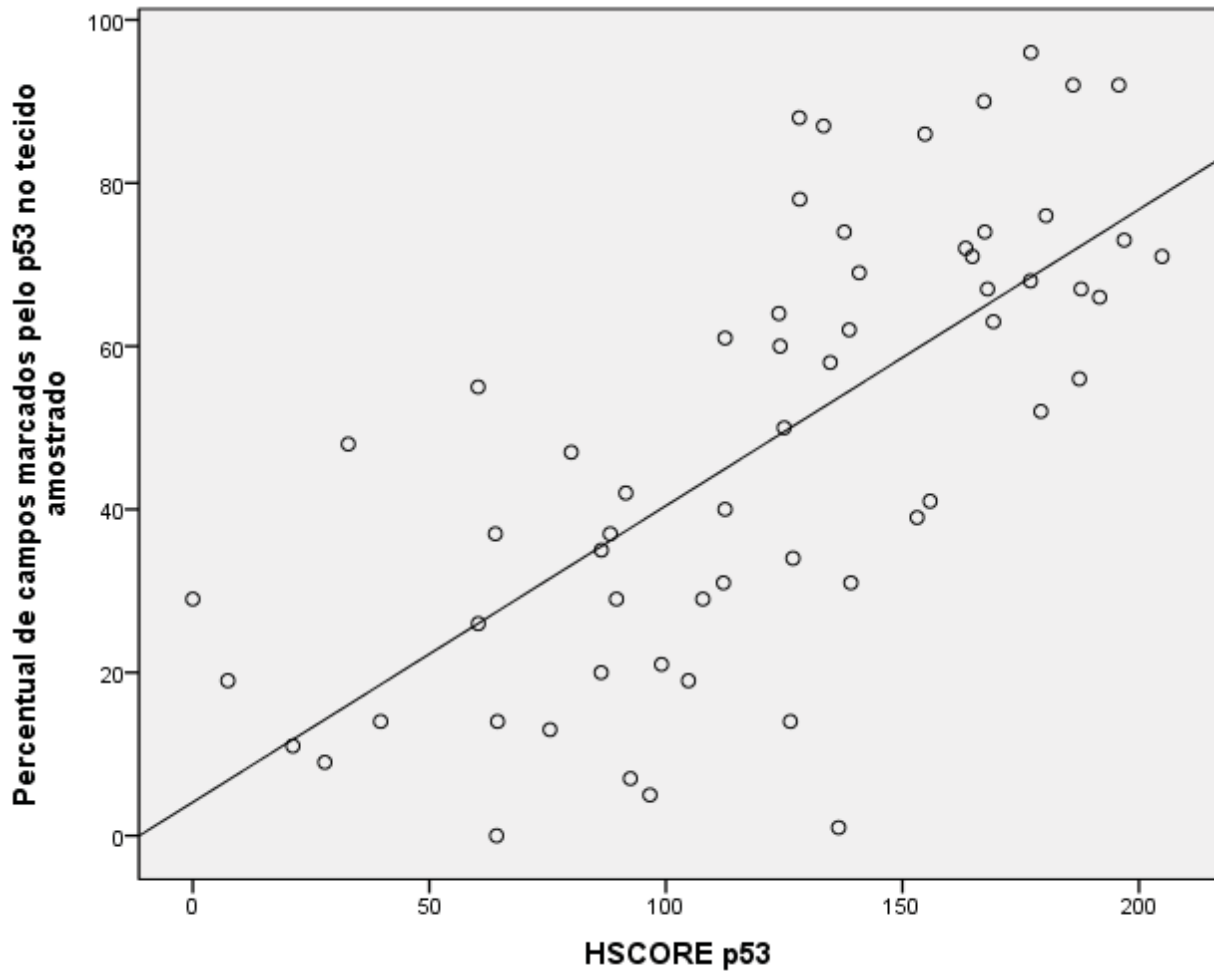
Esses elementos indicam a expectativa de aumento, nas próximas décadas, na incidência de QAs e do desenvolvimento de CECs a partir dessas lesões, alertando à comunidade dermatológica a necessidade de abordagens preventivas eficazes, precocemente, nos pacientes de risco.

Finalmente, resultados de estudos que evidenciem os fatores de risco comportamentais, de exposição, ou elementos preventivos são fundamentais na proposta de regulamentação sanitária de profissões associadas à maior probabilidade de desenvolvimento de neoplasias cutâneas.

8. Apêndices

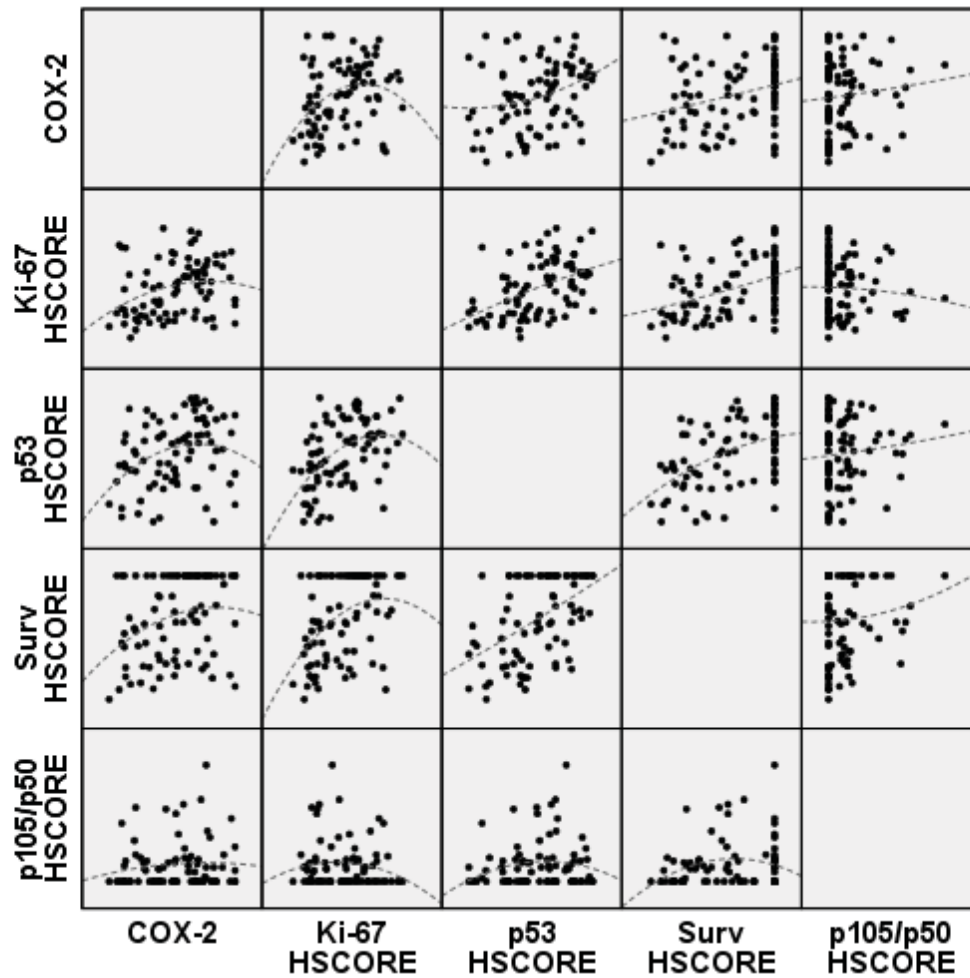
Apêndice 1

Correlação entre avaliação semiquantitativa HSCORE e avaliação quantitativa do percentual de campos marcados pelo p53 ($r_{\text{Pearson}}=0,70$; $p<0,01$) em cada tecido amostrado.



Apêndice 2


Matriz de dispersão de pontos da expressão entre os marcadores teciduais estudados.




9. Anexos

Anexo 1

Parecer do comitê de ética em pesquisa da Faculdade de Medicina da Unesp de Botucatu do estudo: Expressão de fatores antiapoptóticos em queratoses actínicas.

 **Universidade Estadual Paulista**
Faculdade de Medicina de Botucatu

Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P.
CEP: 18.618-970
Fone/Fax: (0xx14) 3811-6143
e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br
e-mail coordenadoria: tsardeni@fmb.unesp.br

 **Ética**

Registrado no Ministério da Saúde
em 30 de abril de 1997

Botucatu, 01 de fevereiro de 2.010 OF. 014/2010-CEP


Ilustríssimo Senhor
Prof. Dr. Hélio Amante Miot
Departamento de Dermatologia e Radioterapia da
Faculdade de Medicina do Campus de Botucatu

Prezado Prof. Hélio,

De ordem do Senhor Coordenador deste CEP, informo que Projeto de Pesquisa, (Protocolo CEP 3424-2010) Expressão de fatores antiapoptóticos em queratoses actínicas, que será conduzido por Juliano Vilaverde Schmitt, orientado por Vossa Senhoria, com a colaboração da Prof^a Dr^a Mariângela Esther Alencar Marques, recebeu do relator parecer favorável, aprovado em reunião de 01 de fevereiro de 2.010.

Situação do Projeto: APROVADO. Ao final da execução deste Projeto, apresentar ao CEP "Relatório Final de Atividades".

Atenciosamente,


Alberto Santos Capelluppi
Secretário do CEP

Anexo 2

Termo de consentimento livre e esclarecido do estudo: Expressão de fatores antiapoptóticos em queratoses actínicas.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(TERMINOLOGIA OBRIGATÓRIO EM ATENDIMENTO A RESOLUÇÃO 196/96 –CNS-MS)

Você foi atendido (a) no ambulatório de Dermatologia da Faculdade de Medicina da Unesp de Botucatu, e recebeu o diagnóstico de “queratose actínica” nos braços.

Você está sendo convidado(a) para participar de um projeto de pesquisa chamado “**EXPRESSÃO DE FATORES ANTIAPOPTÓTICOS EM QUERATOSES ACTÍNICAS**”.

É através das pesquisas clínicas que ocorrem os avanços importantes em todas as áreas, e sua participação é fundamental.

Esta pesquisa pretende estudar alterações que ocorrem nas lesões de pele chamadas queratoses actínicas, as quais apresentam risco de evoluir para câncer de pele se não tratadas. Essa análise permitirá uma maior compreensão dos processos que levam ao câncer de pele assim como poderá trazer novas perspectivas de tratamento.

Caso você participe da pesquisa, serão feitas algumas perguntas sobre sua saúde e uso de medicações. Conforme é de seu conhecimento, você está sendo atendido(a) para o tratamento de queratoses actínicas nos braços, e foi agendada a remoção dessas lesões.

Para participar dessa pesquisa, solicitamos que uma das lesões a ser tratada no seu braço, seja removida com uma pequena cirurgia, usando anestesia local, e costurada. Um pequeno fragmento de 3 milímetros da pele da axila é também necessário para permitir comparação entre a lesão e a pele normal. Deve ser realizado curativo nas lesões e após sete dias o fio de sutura será removido nessa instituição.

Durante o procedimento, pode haver leve desconforto no local e, durante os 7 dias de curativos em casa, pode haver sangramento, inchaço e dor nos locais dos cortes da pele.

Caso você não queira participar da pesquisa, é seu direito e isso não vai interferir com o seu tratamento ou a preferência de agendamento médico.

Caso você precise de orientação, ou auxílio médico decorrente do atendimento nesse ambulatório ou do procedimento realizado deve procurar os responsáveis pela pesquisa, Dr. Juliano Vilaverde Schmitt ou Dr. Hélio Amante Miot de segunda à sexta-feira através dos telefones (41) 3024-2757 e (14) 3882-4922.

Estão garantidas todas as informações que você necessitar, antes durante e depois do estudo.

Uma via desse termo de consentimento deve ser guardada com você, e outra será arquivada junto ao pesquisador. A sua participação neste estudo é voluntária. Porém, se você não quiser mais fazer parte da pesquisa poderá solicitar de volta o termo de consentimento livre esclarecido assinado.

As informações relacionadas ao estudo poderão ser inspecionadas pelos médicos que executam a pesquisa e pelas autoridades legais. No entanto, se qualquer informação for divulgada em relatório ou publicação, isto será feito sob forma codificada, para que seu nome ou sua identificação sejam privativos.

Todas as despesas necessárias para a realização da pesquisa são da responsabilidade do pesquisador. Pela sua participação no estudo, você não receberá nenhum valor em dinheiro.

Quando os resultados forem publicados, não aparecerá seu nome, e sim um código.

Eu, _____ li o texto acima e compreendi a natureza e objetivo do estudo do qual fui convidado a participar. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação no estudo a qualquer momento sem justificar minha decisão e sem que esta decisão afete meu tratamento.

Eu concordo voluntariamente em participar deste estudo.

Nome do paciente:.....Assinatura:.....

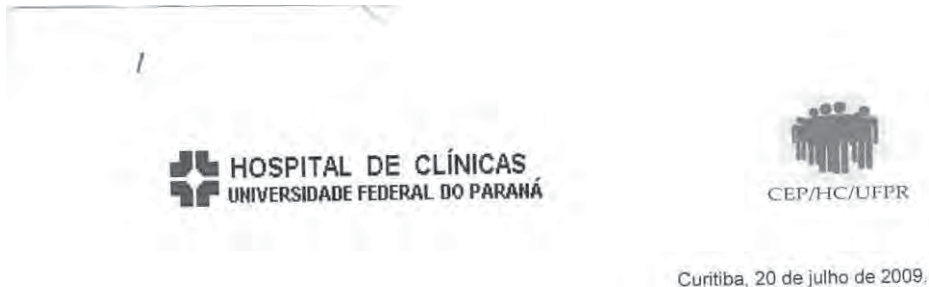
Dr. Juliano V. Schmitt Data:...../...../.....Assinatura:.....

Orientador: Hélio Amante Miot, Rua Magnólia, 400. Fone: (14)3882-4922. E-mail: heliomiot@uol.com.br. Pesquisador(a): Juliano

Vilaverde Schmitt, Fundação Pró-Hansen. Fone (41) 3024-2757 / 3077-9757. E-mail: julivs@gmail.com.

Anexo 3

Parecer do comitê de ética em pesquisa com seres humanos do Hospital de Clínicas de Curitiba do estudo: Ácido acetilsalicílico e risco de queratoses actínicas: um estudo caso-controle.



Ilmo (a) Sr. (a)
Dr. Juliano Vilaverde Schmitt
Curitiba - PR

Prezado Pesquisador:


Comunicamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "ÁCIDO ACETILSALICÍLICO E RISCO DE QUERATOSES ACTÍNICAS", foi analisado com pendências pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, em reunião realizada no dia 31 de março de 2009. Após sanar as pendências, consideramos aprovado em 20 de julho de 2009. O referido projeto atende aos aspectos das Resoluções CNS 196/96, e demais, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Ministério da Saúde.

CAAE: 0073.0.208.000-09
Registro CEP: 299.EXT.005/2009-03

Conforme a Resolução 196/96, solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos.

Data para entrega do primeiro relatório: 20 de janeiro de 2010.

Atenciosamente,


Renato Tambara Filho
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
em Seres Humanos do Hospital de Clínicas/UFPR

Anexo 4

Termo de consentimento livre e esclarecido do estudo: **Ácido acetilsalicílico e risco de queratoses actínicas: um estudo caso-controle.**

TERMO DE CONSENTIMENTO ESCLARECIDO

(TERMINOLOGIA OBRIGATÓRIO EM ATENDIMENTO A RESOLUÇÃO 196/96 –CNS-MS)

Você foi atendido(a) no ambulatório geral de dermatologia da Fundação Pró-Hansen e recebeu um convite para participar de um projeto de pesquisa chamado "**ÁCIDO ACETILSALICÍLICO E RISCO DE QUERATOSES ACTÍNICAS**" que pretende estudar a relação entre o uso prolongado do ácido acetilsalicílico e a prevenção de lesões de pele relacionadas ao desenvolvimento do câncer de pele.

A pesquisa consta apenas de algumas perguntas sobre seus hábitos, sua profissão e sua infância. Logo após, sua pele será examinada para a verificação de algumas alterações relacionadas à exposição ao sol.

Caso você não queira participar da pesquisa, é seu direito e isso não vai interferir com o seu tratamento ou a preferência de agendamento médico.

Caso você precise de orientação, ou auxílio médico decorrente do atendimento nesse ambulatório, deve procurar o responsável pela pesquisa, Dr. Juliano Vilaverde Schmitt, na Fundação Pró-Hansen, fone (41) 3024-9757.

Uma via desse termo de consentimento deve ser guardada com o sujeito da pesquisa, e outra será arquivada junto ao pesquisador.

CONCORDO EM PARTICIPAR DA PESQUISA

Nome do paciente:.....Assinatura:.....

Dr. Juliano V. Schmitt Data:...../...../.....Assinatura:.....

Orientador: Hélio Amante Miot, Rua Manoel Fernandes Cardoso, 690, casa 14. Fone: (14)3882-4922. E-mail: heliomiot@uol.com.br. Pesquisador(a): Juliano Vilaverde Schmitt, Fundação Pró-Hansen. Fone (41) 3024-2757. E-mail: julivs@gmail.com.

Anexo 5

Correlação entre avaliação semiquantitativa HSCORE e avaliação morfométrica computacional da marcação epidérmica do p53 ($r_{\text{Pearson}}=0,99$; $p<0,01$) – dados ainda não publicados.

