



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

**MICHELLE ETIENNE BAPTISTELLA FLORENCE**

**ETAPAS DA PROGRESSÃO DO CARCINOMA ESPINOCELULAR  
CUTÂNEO - estudo imuno-histoquímico das proteínas p53 e Ki-67 e  
de marcadores endoteliais**

***“STEPS OF PROGRESSION IN CUTANEOUS SQUAMOUS CELL CARCINOMA -  
an immunohistochemical study of p53 and Ki-67 proteins  
and endothelial markers”***

**CAMPINAS  
2015**

**MICHELLE ETIENNE BAPTISTELLA FLORENCE**

**ETAPAS DA PROGRESSÃO DO CARCINOMA ESPINOCELULAR  
CUTÂNEO - estudo imuno-histoquímico das proteínas p53 e Ki-67  
e de marcadores endoteliais**

***“STEPS OF PROGRESSION IN CUTANEOUS SQUAMOUS CELL CARCINOMA -  
an immunohistochemical study of p53 and Ki-67 proteins  
and endothelial markers”***

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutora em Ciências na área de concentração em Clínica Médica

*“Thesis of Doctorate presented to the School of Medical Sciences, University of Campinas for obtaining the title of Doctor in Science in the concentration area of Internal Medicine”*

**ORIENTADOR: PROF. DR. ELEMIR MACEDO DE SOUZA**

**COORIENTADOR: PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. MARIA LETÍCIA CINTRA**

Este exemplar corresponde à versão final da tese defendida pela aluna **MICHELLE ETIENNE BAPTISTELLA FLORENCE** e orientada pelo **PROF DR ELEMIR MACEDO DE SOUZA**

**CAMPINAS**

**2015**

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): FAPESP, 07/52603-0

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas  
Ana Paula de Moraes e Oliveira - CRB 8/8985

F662e Florence, Michelle Etienne Baptistella, 1978-  
Etapas da progressão do carcinoma espinocelular cutâneo - estudo imuno-  
histoquímico das proteínas p53 e Ki-67 e de marcadores endoteliais / Michelle  
Etienne Baptistella Florence. – Campinas, SP : [s.n.], 2015.

Orientador: Elemir Macedo de Souza.

Coorientador: Maria Letícia Cintra.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de  
Ciências Médicas.

1. Ceratose actínica. 2. Neovascularização patológica. 3. Proliferação de  
células. 4. Marcadores biológicos de tumor. 5. Apoptose. I. Souza, Elemir  
Macedo de, 1942-. II. Cintra, Maria Letícia. III. Universidade Estadual de  
Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

#### Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Steps of progression in cutaneous squamous cell carcinoma - an immunohistochemical study of p53 and Ki67 proteins and endothelial markers

**Palavras-chave em inglês:**

Keratosis, Actinic

Neovascularization, Pathologic

Cell proliferation

Tumors markers, Biological

Apoptosis

**Área de concentração:** Clínica Médica

**Titulação:** Doutora em Ciências

**Banca examinadora:**

Elemir Macedo de Souza [Orientador]

Fernando Augusto de Almeida

Paulo Ricardo Criado

Paulo Eduardo Neves Ferreira Velho

Eliane Maria Ingrid Amstalden

**Data de defesa:** 17-12-2015

**Programa de Pós-Graduação:** Clínica Médica

**BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO**  
**MICHELLE ETIENNE BAPTISTELLA FLORENCE**

---

**ORIENTADOR: PROF. DR. ELEMIR MACEDO DE SOUZA**

**COORIENTADOR: PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. MARIA LETÍCIA CINTRA**

---

**MEMBROS:**

- 1. PROF. DR. ELEMIR MACEDO DE SOUZA**
  - 2. PROF. DR. FERNANDO AUGUSTO DE ALMEIDA**
  - 3. PROF. DR. PAULO RICARDO CRIADO**
  - 4. PROF. DR. PAULO EDUARDO NEVES FERREIRA VELHO**
  - 5. PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. ELIANE MARIA INGRID AMSTALDEN**
- 

Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros da banca examinadora encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

**Data: 17/12/2015**

**DEDICATÓRIA**

À minha família.

## AGRADECIMENTOS



A minha gratidão,

Aos queridos professores que apontaram o caminho com tanta sabedoria, paciência e generosidade.

Aos colegas e funcionários que ofereceram apoio e solidariedade ao longo desta trajetória.

Da Universidade Estadual de Campinas:

Prof. Dr. Elemir Macedo de Souza, Disciplina de Dermatologia -  
Departamento de Clínica Médica.

Profa. Dra. Maria Leticia Cintra, Departamento de Anatomia Patológica.

Prof. Dr. Konradin Metze, Departamento de Anatomia Patológica.

Profa. Dra. Renata Ferreira Magalhães, Disciplina de Dermatologia -  
Departamento de Clínica Médica.

Dermatologista Juliana Yumi Massuda, Disciplina de Dermatologia -  
Departamento de Clínica Médica.

Patologista Rafael Fantelli Stelini, Departamento de Anatomia Patológica.

Dra. Ana Flávia de Mattos Costa, Departamento de Anatomia Patológica.

Dra. Tania Cristina Benetti Soares, Departamento de Anatomia Patológica

Adilson Abilio Piazza, Departamento de Anatomia Patológica.

Ana Claudia Sparapani Piazza, Laboratório de Imuno-histoquímica,  
Departamento de Anatomia Patológica.

Luzia Aparecida Magalhães Ribeiro Reis, Laboratório de Imuno-  
histoquímica, Departamento de Anatomia Patológica..

Da Universidade de Würzburg - Alemanha:

Profa. Dra. Eva-Bettina Bröcker, Departamento de Dermatologia,  
Venereologia e Alergologia.

Dra. Lidia Marília Poppe, Departamento de Dermatologia, Venereologia e  
Alergologia.

Funcionários do Laboratório de Imuno-histoquímica.

## RESUMO

As etapas cruciais da carcinogênese cutânea incluem disfunção da proteína supressora tumoral p53 e angiogênese. A contribuição de tais eventos, individual e sinergicamente, ainda não está bem estabelecida na cascata de fenômenos que resultam no carcinoma espinocelular cutâneo.

Objetivou-se avaliar a expressão imuno-histoquímica da p53, o índice proliferativo e a angiogênese nos estádios evolutivos do carcinoma espinocelular cutâneo, e investigar a relação da expressão da p53 com as demais variáveis.

Foram estimadas as porcentagens de células imunomarcadas para p53 e Ki-67 em três grupos de cânceres: 30 queratoses solares, 30 carcinomas espinocelulares superficialmente invasores e 30 carcinomas espinocelulares invasores. O método Chalkley foi utilizado para quantificar a área microvascular, empregando-se marcador de neoangiogênese (CD105) e pan-endotelial (CD34) em cada grupo.

A área microvascular em amostras marcadas pelo CD105 aumentou, significativamente, com a progressão do carcinoma espinocelular cutâneo. O mesmo não ocorreu com o uso do CD34. Contudo, nos três grupos (queratose solar, carcinoma espinocelular superficialmente invasor e invasor) encontrou-se aumento significativo da área microvascular, com ambos os marcadores (CD34 e CD105), em comparação à respectiva pele adjacente. Não houve diferença significativa na taxa de células positivas para p53 e Ki-67 entre os grupos. Encontrou-se correlação positiva e significativa entre a área microvascular marcada pelo CD105 e o índice de marcação para a p53 no carcinoma espinocelular superficialmente invasor, bem como entre o índice de marcação para p53 e para o Ki-67 no carcinoma espinocelular invasor.

A conversão angiogênica é um evento precoce no carcinoma espinocelular cutâneo, e a neovascularização é paralela à progressão do tumor. O uso do CD105 permite avaliar a atividade angiogênica nos tumores escamosos. A angiogênese no estágio inicial da invasão e a atividade proliferativa na fase francamente invasora estão associadas com a expressão imuno-histoquímica da proteína p53. A perda da

função supressora tumoral da p53, em etapas progressivas, atua diretamente na carcinogênese cutânea.

**Palavras-chave:** Queratose Actínica, Neovascularização Patológica, Proliferação de Células, Marcadores Biológicos de Tumor, Apoptose.

## ABSTRACT

Multistep skin carcinogenesis crucially involves loss of function of p53 tumor suppressor protein and angiogenesis. The contribution of such events, individually and synergically, is not well established in the cascade of phenomena that results in cutaneous squamous cell carcinoma.

We aimed to evaluate the immunohistochemical expression of p53, the proliferative index and angiogenesis in spectral stages of cutaneous squamous cell carcinoma, and investigate the relationship between p53 expression with the other variables.

We estimated the percentages of immunostained cells for p53 and Ki-67 (proliferation marker) in three groups of cancer: 30 solar keratoses, 30 superficially invasive squamous cell carcinomas and 30 invasive squamous cell carcinomas. The Chalkley method was used to quantify the microvascular area by neoangiogenesis (CD105) and panendothelial (CD34) immunomarker in each group.

The microvascular area in CD105-stained specimens significantly increased with cutaneous squamous cell carcinoma progression. However, no differences between groups were found in CD34 sections. Solar keratosis, superficially invasive squamous cell carcinoma and invasive squamous cell carcinoma samples showed significant increases in microvascular area for both CD34- and CD105-stained specimens compared with the respective adjacent skin. There was no significant difference for the rate of p53- and Ki-67-positive cells between the groups. Significant positive correlation was found between the CD105 microvascular area and the rate of p53 positive cells in superficially invasive squamous cell carcinoma as well as between the rate of p53- and Ki-67-positive cells in invasive squamous cell carcinoma.

The angiogenic switch is an early event in cutaneous squamous cell carcinoma, and the rate of neovascularization is parallel to tumor progression. In contrast to panendothelial markers, CD105 use allows evaluating angiogenic activity in squamous tumors. Neovascularization in the initial stage of invasion and proliferative activity in the frankly invasive stage were both associated with p53

immunoexpression. Loss of p53 tumor suppressor function through progressive steps is directly involved in skin carcinogenesis.

**Key words:** Keratosis, Actinic; Neovascularization, Pathologic; Cell Proliferation; Tumor Markers, Biological; Apoptosis.

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>CBC</b>	Carcinoma(s) basocelular(es)
<b>CC</b>	Contagem de Chalkley
<b>CC-CD105</b>	Contagem de Chalkley para vasos marcados pelo CD105
<b>CC-CD34</b>	Contagem de Chalkley para vasos marcados pelo CD34
<b>CD105</b>	Endogлина
<b>CD34</b>	Marcador do antígeno CD34 (pan-endotelial)
<b>CEC</b>	Carcinoma espinocelular
<b>CECC</b>	Carcinoma(s) espinocelular(es) cutâneo(s)
<b>CECCi</b>	Carcinoma espinocelular invasor
<b>CECCsi</b>	Carcinoma espinocelular superficialmente invasor
<b>CPNM</b>	Câncer de pele não melanoma
<b>DMV</b>	Densidade microvascular
<b>IH</b>	Imuno-histoquímico(a)
<b>IMKi-67</b>	Índice de marcação para Ki-67
<b>IMp53</b>	Índice de marcação para p53
<b>Ki-67</b>	Antígeno Ki-67
<b>MIB-1</b>	Clone do antígeno Ki-67
<b>p53</b>	Proteína 53
<b>QSo</b>	Queratose(s) solar(es)

<b>RUV</b>	Radiação ultravioleta
<b>TGF</b>	Transforming growth factor
<b>TP53</b>	Gene codificador da proteína 53
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>UVA</b>	Radiação ultravioleta A
<b>UVB</b>	Radiação ultravioleta B

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
<b>Figura 1-</b> Estádios progressivos do CEC cutâneo no dorso da mão.....	18
<b>Figura 2-</b> Carcinogênese mutiestadiada.....	20
<b>Figura 3-</b> Mutação tipo assinatura ultravioleta.....	21
<b>Figura 4-</b> Quantificação do índice de marcação para p53 via Imagelab.....	29
<b>Figura 5-</b> Sumário gráfico da avaliação imuno-histoquímica.....	43
<b>Figura 6-</b> Estádios histológicos evolutivos do CECC.....	45

## LISTA DE QUADROS E TABELA

### QUADROS

	<b>Pág.</b>
<b>Quadro 1-</b> Sumário dos procedimentos imuno-histoquímicos utilizados.....	27
<b>Quadro 2-</b> Descrição dos testes estatísticos.....	30

### TABELA

	<b>Pág.</b>
<b>Tabela 1-</b> Número de tumores estudados (n) por marcador em cada grupo.....	31

## SUMÁRIO

	<b>Pág.</b>
<b>1- INTRODUÇÃO</b> .....	17
<b>1.1- Considerações gerais</b> .....	17
<b>1.2- Epidemiologia</b> .....	19
<b>1.3- Fotocarcinogênese</b> .....	19
<b>1.4- Proteínas p53 e Ki-67</b> .....	21
<b>1.5- Angiogênese</b> .....	23
<b>1.6- A angiogênese e a progressão do carcinoma espinocelular cutâneo</b> .....	24
<b>2- OBJETIVOS</b> .....	25
<b>3- MÉTODOS</b> .....	26
<b>3.1- Seleção dos casos</b> .....	26
<b>3.2- Avaliação imuno-histoquímica</b> .....	27
<b>3.3- Análise estatística</b> .....	30
<b>4- RESULTADOS</b> .....	31
<b>4.1- Artigo 1- Angiogenesis in the progression of cutaneous squamous cell carcinoma: an immunohistochemical study of endothelial markers</b> .....	32
<b>4.2- Artigo 2- p53 immunexpression in stepwise progression of cutaneous squamous cell carcinoma and correlation with angiogenesis and cellular proliferation</b> .....	36
<b>5- DISCUSSÃO</b> .....	43
<b>6- CONCLUSÃO</b> .....	50
<b>7- REFERÊNCIAS</b> .....	51
<b>8- ANEXOS</b> .....	58

## INTRODUÇÃO

### 1.1- Considerações gerais

Proteus seria o pai mítico do câncer por sua capacidade de adotar formas inúmeras e miméticas, com o propósito de não ser identificado e questionado<sup>1</sup>. Comparativamente, os tumores têm natureza multifacetada, morfologia e fisiopatogenia intrincadas, que, ao certo, suplantariam as artimanhas divinas. Analisar miudamente o câncer, na tentativa de desvendar detalhes acerca do seu complexo funcionamento, é um exercício desafiador, quiçá transcendental. O carcinoma espinocelular cutâneo (CECC), foco do estudo em questão, é especialmente singular por suas características morfológico-evolutivas que despertam e merecem reflexões.

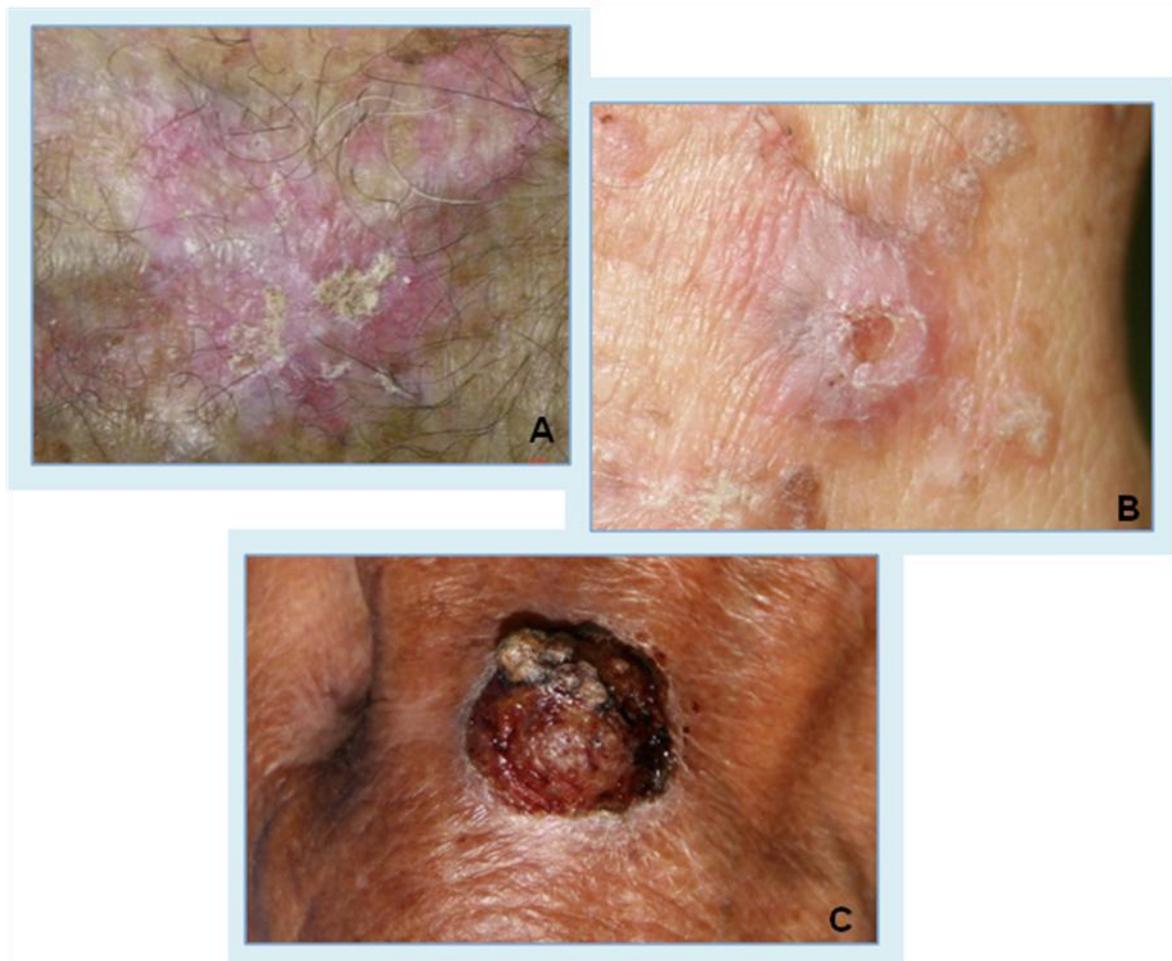
Os achados anatomo-clínicos do CECC são espectrais e podem ser avaliados desde as fases mais incipientes. A queratose solar<sup>a</sup> (QSo) é a manifestação clínica inicial e caracteriza-se por lesão áspera e seca, e de coloração amarela ou castanho-acinzentada, com eritema variável (Figura 1A). A queratinização anômala (queratose) advém da proliferação atípica de queratinócitos. A QSo é considerada a forma intraepidérmica do CECC, uma vez que não há critérios clínico-patológicos definitivos que estabeleçam diferenças entre ambos, tampouco a previsibilidade de sua agressividade<sup>2</sup>.

A transição gradual para fases mais graves do CECC, por acúmulo de alterações moleculares, é sutil no âmbito clínico-patológico. Tal fato é ilustrado no modelo proposto por Berhane et al., em que 50% das lesões tidas como QSo inflamadas (com eritema e dor) foram consideradas carcinomas espinocelulares à histologia<sup>3</sup>. Ao exame dermatológico, suspeita-se de que o tumor tenha invadido a derme diante do aparecimento de infiltração, endureção e halo inflamatório<sup>4</sup> (Figura 1B). À microscopia ótica, não há elementos precisos que discriminem, arquiteturalmente, quando o componente epitelial neoplásico adentra o não epitelial (derme), visto que a expansão das células tumorais imita o crescimento da epiderme sã e remete a falanges apontando a profundidade<sup>5</sup>.

---

<sup>a</sup>O termo queratose actínica foi substituído por queratose solar, uma vez que este especifica a origem dos raios luminosos responsáveis pelas lesões cutâneas estudadas.

O CECC pode apresentar tamanho e volume variáveis, com superfície verrucosa, ulcerada, vegetante, crateriforme, entre outras (Figura 1C). A neoplasia é, frequentemente, indolente, porém tem potencial agressivo e pode levar à destruição tecidual por contiguidade, à disseminação para linfonodos e outros órgãos, e à morte. Os fatores prognósticos de metástase nodal e do êxito letal são: tamanho maior que dois centímetros, diferenciação menor, invasão do subcutâneo e do espaço perineural<sup>6</sup>.



**Figura 1-** Estádios progressivos do CEC cutâneo no dorso da mão: forma intraepidérmica **(A)**, lesão com sinais invasão dérmica (escamo-crosta e infiltração) **(B)**, tumor invasor **(C)**. Fonte: acervo fotográfico da Disciplina de Dermatologia - FCM - Unicamp.

## 1.2- Epidemiologia

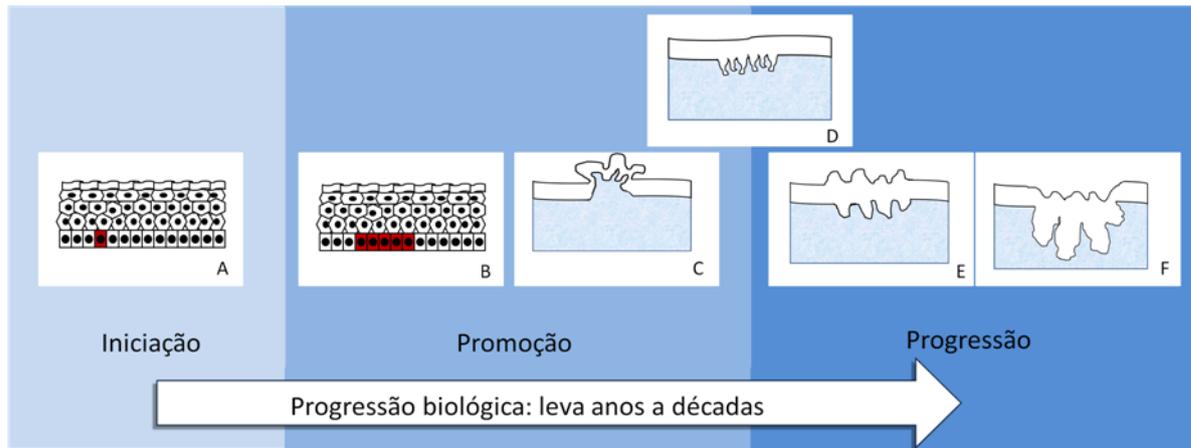
No Brasil, apesar de subdiagnosticado e subnotificado, o câncer de pele não melanoma (CPNM) é o mais incidente na população. Preveem-se 182.000 casos novos/ano para 2014 e 2015, que correspondem a 25% de todos os tumores malignos estimados no país<sup>7</sup>. O CECC perfaz 20 a 30% dos casos de CPNM e ocupa a segunda posição, precedido pelo carcinoma basocelular (CBC).

A incidência do CECC aumentou em torno de 50 a 200% na América nas últimas três décadas<sup>8</sup>, o que constitui um alarmante problema, com impacto econômico individual e para a saúde pública<sup>9</sup>. Cerca de 4% dos pacientes têm metástase nodal<sup>10</sup> e 1,5% morrem em decorrência do CECC<sup>11</sup>, o maior responsável pelas mortes entre os CPNM.

## 1.3- Fotocarcinogênese

Carcinogênese (ou tumorigênese) é a cascata de eventos que resulta na formação do câncer<sup>12</sup>. Neste estudo, o termo carcinogênese designa a transformação maligna a partir da célula sã, o crescimento e a disseminação do tumor, por considerá-los desdobramentos evolutivos.

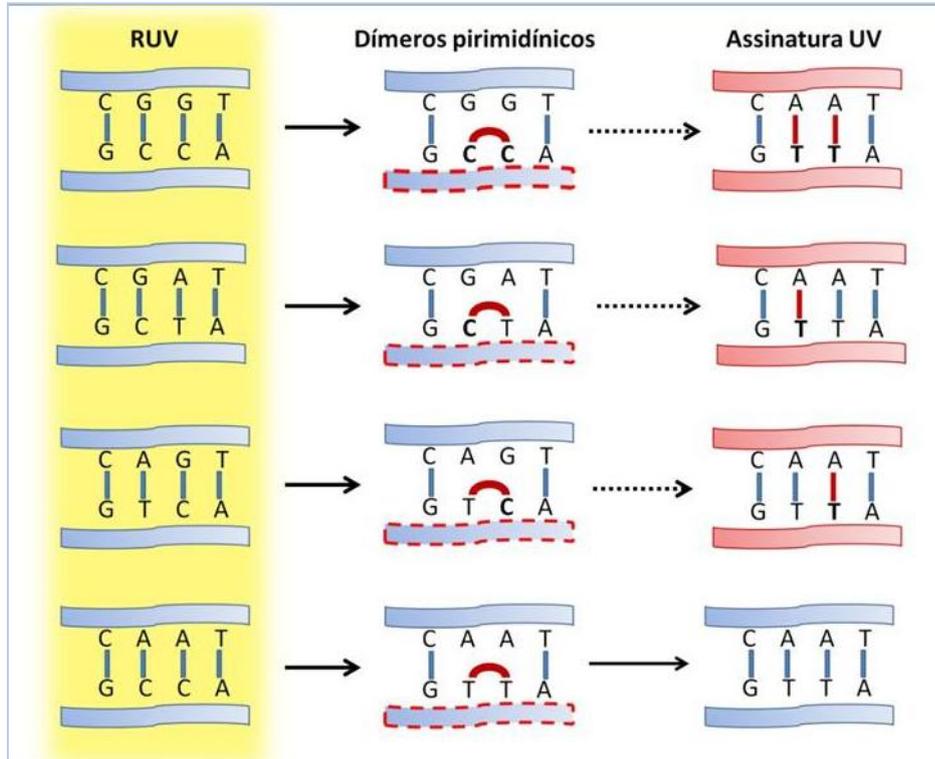
O acúmulo interativo de alterações genéticas, epigenéticas, bioquímicas e imunológicas, no microambiente tumoral, fundamenta a progressão biológica tumoral. Modelos animais - cujo substrato inicial incluiu a pele de camundongos - submetidos a doses baixas de agentes carcinogênicos permitiram o estabelecimento dos múltiplos estádios, sequenciais e escalonados, da carcinogênese, aplicáveis ao câncer humano<sup>12</sup> (Figura 2).



**Figura 2-** Carcinogênese multiestadiada. Na iniciação, o gene crítico de uma célula sofre mutação, geralmente, de uma célula tronco **(A)**. Durante a promoção, ocorre a expansão clonal da célula que contém a mutação **(B)**, o que aumenta a chance de esta célula sofrer outras mutações. A proliferação celular crônica resulta no aparecimento dos papilomas nos modelos animais **(C)**. A queratose solar **(D)** é considerada pré-neoplásica pela maioria dos autores. A progressão tumoral decorre de novas alterações genéticas, levando à maior agressividade (conversão maligna), invasão **(E, F)** e metástase. A queratose solar, por seu perfil molecular e morfológico, pode ser compreendida como elemento da progressão. Adaptado de: Vulimiri SV, DiGiovanni J. Carcinogênese, in: Pollock RE (Ed), UICC manual de oncologia clínica, oitava ed. Fundação Oncocentro de São Paulo, São Paulo, 2006. p.31.

A iniciação do câncer, na maioria dos casos, advém da atuação de um carcinógeno sobre o genoma<sup>3</sup>, com conseqüente inibição de um gene supressor tumoral ou ativação de um oncogene<sup>13</sup> (Figura 2). A mutação do gene supressor tumoral p53 (TP53) ocorre em cerca de 90% dos CECC<sup>14</sup>, e o espectro ultravioleta (UV) da luz solar é o principal indutor, especialmente, o feixe ultravioleta B (UVB) e, em menor grau, o ultravioleta A (UVA)<sup>13</sup>.

O DNA do queratinócito absorve a radiação ultravioleta (RUV) e sofre rearranjos moleculares. Quando não corrigidos pelos mecanismos de reparo do DNA, originam mutações específicas, conhecidas como assinatura ultravioleta. Consistem de mudanças de citosina para timina (C-T), ou transição em série de duas citosinas para duas timinas (CC-TT)<sup>15</sup> (Figura 3). O TP53 sofre mutação do tipo assinatura UV na maioria dos CECC<sup>14</sup>.



**Figura 3-** Mutação tipo assinatura ultravioleta. A absorção da radiação ultravioleta induz a formação de ligações covalentes entre bases pirimidínicas adjacentes, estruturas conhecidas como dímeros pirimidínicos. Há uma distorção configuracional da cadeia de DNA, levando os dímeros a ligarem-se sempre a adeninas na fita oposta durante a primeira replicação. Em seguida (na segunda replicação celular), tal adenina será pareada com timina, que substitui a citosina original. RUV: radiação ultravioleta; Assinatura UV: assinatura ultravioleta. Adaptado de: Capitano JS. Instabilidade genômica em carcinoma basocelular humano revelada através da análise de sequências repetitivas [Dissertação]. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo; 2008.

#### 1.4- Proteínas p53 e Ki-67

O TP53 codifica uma fosfoproteína nuclear de 53 quilodaltons, conhecida como proteína 53 (p53). Ao ser transcrita, garante a integridade do genoma por meio: **I)** do controle do ciclo celular, **II)** do reparo do DNA, **III)** e da indução da apoptose e da senescência, além de outras funções oncosupressoras como inibição da angiogênese.

Quando sofre mutação, a p53 perde a capacidade de ligar-se a sequências específicas de DNA e ativar genes alvos. Estas células tornam-se instáveis e tem o potencial de acumular anormalidades genéticas, como novas mutações e rearranjos cromossômicos<sup>16,17</sup>. A promoção tumoral, desencadeada por nova exposição UV, decorre da vantagem clonal das células que sofreram mutação em relação às vizinhas, uma vez que estas sofreriam apoptose induzida pela p53 selvagem, e aquelas, não<sup>14,18,19</sup>.

A mutação do TP53 é idêntica nas porções intraepidérmica e invasora do CECC<sup>20,21</sup>, porém é diferente em comparação à da pele cronicamente fotoexposta adjacente<sup>20</sup>. Na transição para a QSo, a célula sofreria nova mutação, que poderia incluir, pela segunda vez, o TP53<sup>21</sup>. Ahmadian et al. demonstraram mutação do TP53 em 70% das amostras da pele fotoexposta (imunomarcada para p53) e das QSo, e perda da heterozigosidade somente nas QSo - em 40% dos casos<sup>22</sup>. Sabe-se que a perda de heterozigosidade é relativamente infrequente no CECC, em comparação a tumores de outros órgãos; em contrapartida, a mutação independente nos dois alelos do TP53 é mais encontrada<sup>18</sup>.

A proteção genômica, atribuída à p53 selvagem, paradoxalmente, pode ocorrer quando a proteína adquire a mutação. As células que contêm mutação do TP53 acumulariam DNA danificado, com conseqüente desvio da mitose, diferenciação e descamação celulares. Para o aparecimento dos clones neoplásicos, segundo Freije et al., este sistema teria de ser burlado por meio de alterações adicionais que suprimissem o bloqueio da duplicação<sup>23</sup>.

A p53 selvagem tem a meia vida muito curta, de seis a 20 minutos<sup>24</sup>. Há positividade imuno-histoquímica (IH) da proteína quando esta se acumula no núcleo: a forma selvagem, sob estímulo genotóxico e hipóxico<sup>25</sup>; e a que sofreu mutação, por ser metabolicamente mais estável - com meia vida entre uma e 24 horas<sup>24</sup>. A expressão IH da p53 relaciona-se com a cronicidade da exposição solar<sup>19</sup>, e é detectável nos diversos estádios do CECC<sup>26,27</sup>.

A multiplicação das células tumorais é um mecanismo-chave na oncogênese<sup>28</sup>. A expansão neoplásica tem como fatores contribuintes: **I)** a auto-suficiência em relação aos sinais reguladores do crescimento tumoral, a saber:

citocinas [como o *transforming growth factor* (TGF)] e interleucinas; **II**) a perda da senescência (potencial replicativo limitado); **III**) a evasão da apoptose, e **IV**) a neovascularização contínua<sup>29</sup>. Os três últimos estão relacionados ao dano funcional da p53.

A proteína Ki-67, codificada por gene localizado no cromossomo 10, é expressa durante as fases G1, S, G2 e M do ciclo celular<sup>30</sup>. A partir de fragmentos recombinantes do antígeno Ki-67 (Ki-67), obteve-se o anticorpo MIB-1<sup>31</sup>, comumente utilizado nos ensaios IH para a avaliação da proliferação tumoral<sup>28</sup>.

A estimativa do índice proliferativo, a partir da taxa de positividade para o Ki-67, é utilizada para prever o comportamento tumoral e o prognóstico de pacientes com alguns tipos de câncer, como o de mama<sup>32</sup>. No CECC, alguns autores apontam para a relação entre proliferação e grau de malignidade<sup>33,34,35,36</sup>, mas há sugestões da distinção das lesões a partir do padrão morfológico da imunomarcação<sup>37,38</sup>.

A p53 apresenta imunomarcação, à técnica IH, nas células periféricas e indiferenciadas do CECC e, portanto, estaria relacionada à capacidade proliferativa da célula tumoral<sup>39</sup>. Tal fato é corroborado pela correlação com a marcação IH pelo Ki-67 demonstrada por alguns autores<sup>33,35,36,40</sup>, e sinaliza os múltiplos papéis da p53 na carcinogênese cutânea.

## 1.5- Angiogênese

A pele necessita da sua rica vascularização para adequada nutrição, oxigenação, remoção de resíduos, via de acesso imunológico e termorregulação<sup>41</sup>. De maneira análoga, o tecido tumoral em crescimento dependerá de suporte vascular adequado<sup>42</sup>. Os vasos, até então quiescentes, passam a ter sua proliferação estimulada pelas células tumorais, por meio de do aumento de substâncias indutoras da multiplicação vascular em relação às inibidoras<sup>43</sup>, fenômeno conhecido como conversão angiogênica (do inglês: *angiogenic switch*). Há o desenvolvimento de novos vasos a partir dos vasos antigos, fenômeno denominado angiogênese.

Conceitualmente, a angiogênese ocorre em situações fisiológicas e patológicas, como nas lesões tumorais e metastáticas. O termo é considerado sinônimo de neoangiogênese e neovascularização.

A indução de novos vasos pode ser dinamicamente estimulada nos diversos estádios da evolução tumoral. Estudos em ratos e humanos apontam para a conversão angiogênica precoce no CECC<sup>44,45,46</sup>.

### **1.6- A angiogênese e a progressão do carcinoma espinocelular cutâneo**

A progressão tumoral, orquestrada pelas alterações moleculares cumulativas, é caracterizada pelo aumento da massa de células neoplásicas, da autonomia celular, do poder de invasão e da capacidade metastática<sup>12</sup>. Nesta fase, o suprimento vascular tumoral e o acesso ao sistema vascular do hospedeiro são cruciais e tem potencial limitante<sup>47</sup>.

As alterações genéticas ligadas à transformação maligna celular, como a inativação de genes supressores tumorais, são responsáveis por parte do recrutamento dos novos vasos<sup>48</sup>. A angiogênese depende do comportamento da p53<sup>47</sup>, que perde a capacidade inibitória quando mutada<sup>49</sup>. Paralelamente, a neovascularização garante o aporte metabólico e o endotélio ativado gera fatores de crescimento parácrinos<sup>50</sup> e contribui para a secreção de enzimas proteolíticas<sup>51,52</sup>, elementos que colaboram com o crescimento tumoral, invasão e metástase.

A angiogênese e a perda da função do TP53 são eventos fundamentais para o desenvolvimento dos tumores e suas inter-relações fisiopatogênicas permanecem pouco exploradas na progressão do CECC.

## OBJETIVOS

### 2.1- Objetivo geral

Avaliar a expressão da proteína p53, o índice proliferativo e a angiogênese nos estádios evolutivos do CECC, e a relação entre eles, a fim de agregar conhecimentos aos mecanismos implicados na carcinogênese cutânea.

### 2.2- Objetivos específicos

#### Artigo 1

- 1) Medir a área microvascular na derme contígua ao fronte tumoral nos grupos do CECC: **I)** queratose solar; **II)** carcinoma espinocelular superficialmente invasor; e **III)** carcinoma espinocelular invasor, utilizando-se dos marcadores imuno-histoquímicos pan-endotelial (CD34) e de vasos neoformados (CD105). Comparar os resultados entre os grupos.
- 2) Medir a área microvascular da derme não afetada adjacente à neoplasia em cada grupo e compará-la com a do fronte tumoral do respectivo grupo.

#### Artigo 2

- 3) Quantificar os índices de marcação das proteínas p53 e Ki-67 (por meio do clone MIB-1) nos seguintes grupos do CECC: **I)** queratose solar; **II)** carcinoma espinocelular superficialmente invasor; e **III)** carcinoma espinocelular invasor. Comparar os resultados entre os grupos.
- 4) Avaliar a relação entre o índice de marcação para p53 e a área microvascular imunomarcada pelo CD105 em cada grupo.
- 5) Avaliar a relação entre o índice de marcação para p53 e para Ki-67 em cada grupo.

## MÉTODOS

### 3.1- Seleção dos casos

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Ministério da Saúde.

Trata-se de um estudo retrospectivo, observacional, descritivo, transversal. Foram resgatados espécimes cirúrgicos de CECC do dorso das mãos, punhos ou antebraços, arquivados (entre 2001 a 2008) no Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Ciências Médicas - Unicamp. As informações clínicas foram obtidas dos prontuários no Serviço de Arquivo Médico. Foram incluídas apenas amostras de indivíduos brancos e excluídas as de pacientes com doenças predisponentes ao câncer de pele, ou seja, poiquilodermia, xeroderma pigmentoso, albinismo, arsenicismo, imunodeficiência e radioterapia prévia.

Os tumores foram classificados em: **I)** QSo, ou CEC intraepidérmico; **II)** carcinoma espinocelular superficialmente invasor (CECsi), quando a neoplasia preenchia a derme papilar e/ou atingia a reticular superficial; e **III)** carcinoma espinocelular invasor (CECi), quando penetrava ou ultrapassava a derme reticular média. Esta subdivisão é rotineiramente utilizada para a avaliação dos CECC, no Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital de Clínicas - Unicamp, por sua praticidade e reprodutibilidade.

A fim de evitar que o processo inflamatório e o remodelamento dérmico modificassem as características vasculares, foram também excluídas as lesões ulceradas ou com fibrose secundária a procedimentos prévios.

As neoplasias que preencheram os critérios descritos foram aleatoriamente selecionadas até completar 30 amostras por grupo.

### 3.2- Avaliação imuno-histoquímica

A técnica empregada foi descrita nos artigos 1 e 2 e resumida no quadro 1.

**Quadro 1-** Material e procedimentos imuno-histoquímicos utilizados

Estudo IH	Anticorpos			
	p53	Ki-67	CD34	CD105
Clone	DO-7	MIB-1	QBEnd10	Sn6h
Diluição	1:100	1:150	1:100	1:10
Recup. Ag.	Calor (Tris-EDTA)	Calor (Tris-EDTA)	Proteinase K	Pepsina
Padrão IH	Núcleo cel. neopl.	Núcleo cel. neopl.	Membr. endot.	Membr. endot.
Controle +	Epitélio adjacente	Epitélio adjacente	Tec. Granulação	Tec. Granulação
Controle -	Omissão ac. 1º	Omissão ac. 1º	Omissão ac. 1º	Omissão ac. 1º

IH: imuno-histoquímico; Recup. ag.: **recuperação antigênica**; Tris-EDTA: **tampão Tris-EDTA (pH 9) na panela a vapor**; Núcleo cel. neopl.: **núcleo da célula neoplásica**; Membr. endot.: **membrana endotelial**; Controle +: **controle positivo**; Controle-: **controle negativo**; Tec. Granulação: **tecido de granulação oriundo de tecido tonsilar**; Omissão ac. 1º: **omissão do anticorpo primário**.

#### 1) Quantificação dos vasos

Dentre as técnicas utilizadas para a morfometria da vasculatura tumoral (revisados no artigo 1), optou-se pelo método Chalkley (estimativa da área ocupada pelos vasos) por sua praticidade e reprodutibilidade<sup>53</sup>.

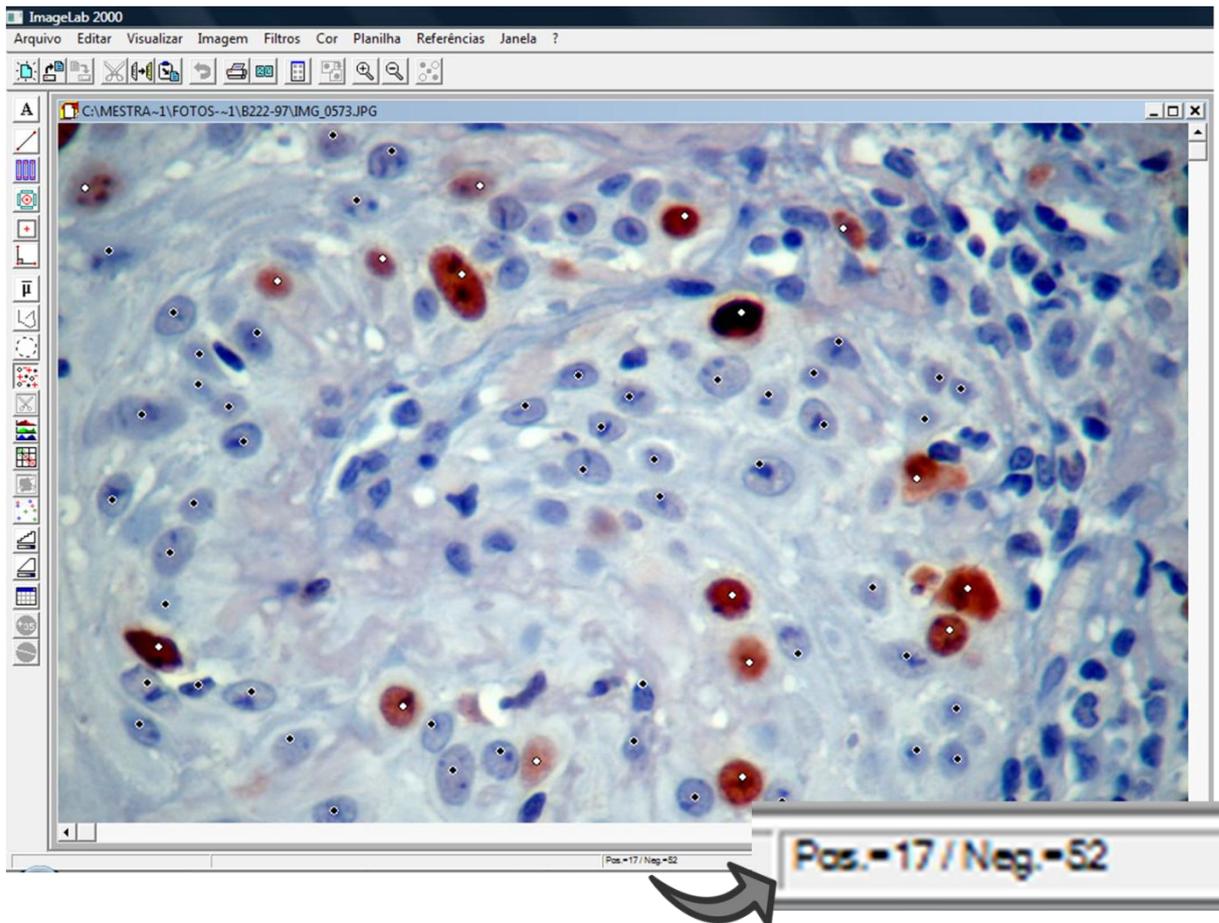
Clones tumorais angiogênicos seriam responsáveis por induzir áreas hipervascularizadas<sup>54</sup>. Os sítios quentes (inglês: *hot spots*), campos selecionados por conter o maior número de células endoteliais imunomarcadas, são amplamente utilizados para a quantificação dos vasos<sup>53</sup>.

Em cada amostra, três sítios quentes, sob o uso do CD34 e CD105, foram selecionados (em aumento de 100x). A ocular com a gráticula de Chalkley era girada, de forma que seus pontos coincidisse com as células endoteliais

imunomarcadas (em aumento de 400x); e o resultado, anotado. O procedimento foi realizado quatro vezes em cada campo, com a gráticula em diferentes posições, escolhendo-se o maior valor. A contagem de Chalkley (CC) resultou da média obtida em três sítios quentes.

## **2) Quantificação da p53 e do Ki-67**

Campos a partir do ponto central do tumor foram sorteados, seguindo a tabela dos números aleatórios de Fischer. O local foi fotografado e marcado para que não se repetisse no próximo sorteio. Obtiveram-se as imagens digitais por meio de câmera fotográfica Canon PowerShot A630 acoplada ao microscópio Nikon Eclipse E200 CX30 (X40 objetiva). As células positivas e negativas foram contadas com o auxílio do software Imagelab 2000<sup>®</sup> (versão 2.4), até o total de, pelo menos, 500 células (Figura 4). O índice de marcação para o p53 (IMp53) e para o Ki-67 (IMKi-67) foi calculado dividindo-se as células positivas pelo total células neoplásicas respectivamente.



**Figura 4-** Quantificação ilustrativa do índice proliferativo, por meio do Ki6, com o uso do programa Imagelab. Os núcleos são marcados manualmente (positivos com pontos brancos, negativos com os pontos pretos), e os valores aparecem ao final da tela. Fonte: Watanabe, IC. Estudo comparativo da angiogenese, expressão de p53 e índice proliferativo em lesões ceratoacantoma-similes, com ênfase na regressão clínica. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas), Unicamp. 2010.

### 3.3- Análise estatística

Os testes estatísticos para análise dos dados foram descritos nos artigos 1 e 2 e encontram-se resumidos na quadro 2.

**Quadro 2-** Descrição dos testes estatísticos

Variáveis	Descrição	Teste estatístico
CC-CD105 CC-CD34	Comparação entre QSo, CECsi e CECi	Análise de variância
CC-CD105 CC-CD34	Comparação entre tumor e pele adjacente	Teste T dependente
IMp53 IMKi-67	Comparação entre QSo, CECsi e CECi	Teste de Kruskal-Wallis
IMp53 CC-CD105 IMKi-67	Correlação entre variáveis	Coeficiente de Spearman

**CC-CD34:** contagem de Chalkley com o CD34; **CC-CD105:** contagem de Chalkely com o CD105; **IMp53:** índice de marcação para p53; **IMKi-67:** índice de marcação para Ki-67; **QSo:** queratose solar; **CECsi:** carcinoma espinocelular superficialmente invasor; **CECi:** carcinoma espinocelular invasor.

## RESULTADOS

Os tumores foram considerados negativos para determinado marcador quando apresentavam controle interno positivo, porém ausência de reação na área estudada. Apenas as amostras cujo controle interno era negativo foram excluídas (*dropouts*). O número final de tumores incluídos no estudo, para cada marcador, encontra-se descrito na Tabela 1.

**Tabela 1-** Número de tumores estudados (n) por marcador em cada grupo

<b>Marcador</b>	<b>QSo</b>	<b>CECsi</b>	<b>CECi</b>
p53	25	28	28
Ki-67	29	29	29
CD105	29	30	30
CD34	29	30	30

**QSo:** queratose solar; **CECsi:** carcinoma espinocelular superficialmente invasor; **CECi:** carcinoma espinocelular invasor; **p53:** proteína 53; **Ki-67:** antígeno Ki-67; **CD34:** marcador pan-endotelial CD34; **CD105:** marcador de neoangiogênese CD105.

## CLINICAL SCIENCE

## Angiogenesis in the progression of cutaneous squamous cell carcinoma: an immunohistochemical study of endothelial markers

Michelle Etienne Baptistella Florence,<sup>1</sup> Juliana Yumi Massuda,<sup>1</sup> Eva-Bettina Bröcker,<sup>II</sup> Konradin Metze,<sup>III</sup> Maria Leticia Cintra,<sup>III</sup> Elemir Macedo de Souza<sup>I</sup>

<sup>I</sup>Department of Internal Medicine, Medical School University of Campinas, São Paulo, Brazil. <sup>II</sup>Department of Pathology, Medical School University of Campinas, São Paulo, Brazil. <sup>III</sup>Department of Dermatology, University of Wuerzburg, Germany.

**OBJECTIVE:** To demonstrate the role of angiogenesis in the progression of cutaneous squamous cell carcinoma.

**INTRODUCTION:** Angiogenesis is a pivotal phenomenon in carcinogenesis. Its time course in cutaneous squamous cell carcinoma has not yet been fully established.

**METHODS:** We studied the vascular bed in 29 solar keratoses, 30 superficially invasive squamous cell carcinomas and 30 invasive squamous cell carcinomas. The Chalkley method was used to quantify the microvascular area by comparing panendothelial (CD34) with neoangiogenesis (CD105) immunohistochemical markers. The vascular bed from non-neoplastic adjacent skin was evaluated in 8 solar keratoses, 10 superficially invasive squamous cell carcinomas and 10 invasive squamous cell carcinomas.

**RESULTS:** The microvascular area in CD105-stained specimens significantly increased in parallel with cutaneous squamous cell carcinoma progression. However, no differences between groups were found in CD34 sections. Solar keratosis, superficially invasive squamous cell carcinoma and invasive squamous cell carcinoma samples showed significant increases in microvascular area for both CD34- and CD105-stained specimens compared with the respective adjacent skin.

**DISCUSSION:** The angiogenic switch occurs early in the development of cutaneous squamous cell carcinoma, and the rate of neovascularization is parallel to tumor progression. In contrast to panendothelial markers, CD105 use allows a dynamic evaluation of tumor angiogenesis.

**CONCLUSION:** This study demonstrated the dependence of skin carcinogenesis on angiogenesis.

**KEYWORDS:** Pathologic neovascularization; CD105 antigen, human; CD34 antigen; skin neoplasms; keratosis, actinic.

Florence MEB, Massuda JY, Bröcker EB, Metze K, Cintra ML, Souza EM. Angiogenesis in the progression of cutaneous squamous cell carcinoma: an immunohistochemical study of endothelial markers. *Clinics*. 2011;66(3):465-468.

Received for publication on November 1, 2010; Review completed on December 7, 2010; Accepted for publication on December 7, 2010

E-mail: [etiennefflorence@yahoo.com.br](mailto:etiennefflorence@yahoo.com.br)

Tel.: 55 19 3521 7169

### INTRODUCTION

Non-melanoma skin cancer is the most common cancer in humans and is more prevalent among fair-skinned individuals.<sup>1</sup> However, if the *in situ* component of cutaneous squamous cell carcinoma (CSCC), that is, solar keratosis (SK), were accounted for in epidemiology, CSCC would be the most frequent human malignancy.<sup>2</sup>

Although the complex events leading to cancer progression are not yet entirely clear, they certainly involve close interactions between neoplastic cells and the microenvironment.<sup>3,4</sup> The recruitment of new capillary blood vessels (angiogenesis) is a prerequisite for clonal expansion, tumor growth, invasion and metastasis in most cancers.<sup>2,5</sup> The dependence on neovascularization for CSCC invasion remains controversial.

A tumor vascular bed may be quantified by different means, including the microvascular density (MVD) and Chalkley microvascular area methods.<sup>6</sup> The evaluation of MVD using panendothelial markers, for example, CD34, may assess the vascular status of a tumor bed but not its angiogenic activity.<sup>7</sup>

CD105, also known as endoglin, is a cell membrane glycoprotein responsible for the modulation of endothelial

responses to transforming growth factor  $\beta$  (TGF $\beta$ ).<sup>8</sup> Endoglin is associated with proliferation and may be induced by hypoxia, thus playing an important role in vascular development and remodelling.<sup>6,8</sup> The expression of CD105 has been repeatedly demonstrated to be strongly positive in tumor vessels when compared with normal tissue.<sup>9,10</sup>

The aim of this study was to quantify the vasculature at the different stages of carcinogenesis of CSCC by comparing panendothelial to neoangiogenesis markers.

## MATERIALS AND METHODS

CSCC specimens from dorsal hands or forearms had been routinely formalin fixed and paraffin embedded, and we randomly retrieved those dated between 2001 and 2009 from the files of the Department of Pathology, Faculty of Medical Sciences, University of Campinas (UNICAMP). A total of 89 hematoxylin-eosin-stained slides were reviewed and divided into 3 groups: 1) the *in situ* component, solar keratosis (SK, N=29); 2) superficially invasive squamous cell carcinoma (siSCC, N=30); and 3) invasive squamous cell carcinoma (iSCC, N=30). Because the borderline between SK and early CSCC is not clear cut and SK satisfies all of the histopathological criteria for CSCC, SK is considered to be a kind of *in situ* CSCC.<sup>2</sup>

Tumors from patients with xeroderma pigmentosum, albinism, arsenicism, any kind of immunosuppression, or a history of previous radiotherapy were not included.

This study was approved by the Research Ethics Committee of the State University of Campinas, Brazil.

### Immunohistochemical staining

The following primary antibodies were used: CD34 (QBEnd-10; DAKO, Glostrup, Denmark) at a dilution of 1:150 and CD105 (SN6h; DAKO, Carpinteria, USA) at a dilution of 1:10. All slides were incubated for 25 minutes and 12 hours at room temperature with CD34 and CD105, respectively. For CD34, antigen retrieval was effected using 0.25% proteinase K (DAKO, Carpinteria, USA) at 37 °C for 10 min. For CD105, antigen retrieval was effected using 0.4% pepsin at 37 °C for 30 min. CD105 sections were also incubated with serum-free protein block (DAKO, Carpinteria, USA) at 37 °C for 30 min. The EnVision Plus polymer (DAKO, Carpinteria, USA) was used as a reaction amplifier. Appropriate control (granulation tissue) was included in each test. Negative control was obtained by omitting the primary antibody. Both CD34 and CD105 are cell membrane proteins; therefore, immunoreactivity was considered positive when a membrane staining pattern was found in endothelial cells.

### Microvessel quantification

The microvessel area was estimated using the Chalkley point counting system,<sup>11</sup> a reproducible method for the immunohistochemical evaluation of angiogenesis.<sup>12,13</sup> Briefly, a 25-point Chalkley eyepiece graticule was applied to the areas of the tumor with the highest microvessel profiles, called hot spots.<sup>6</sup> The intersecting points were recorded at a specific magnification, as was the corresponding defined Chalkley grid area. The Chalkley count was calculated as the mean value of three or four graticule counts.

Histological sections were blindly scanned at low magnification (100 $\times$ ) by two observers to identify the hot spots in tumor fronts, i.e., in the boundary stroma from

typical areas of the three groups. A 25-point Chalkley eyepiece graticule was then applied to each hot spot, using a magnification of 400 $\times$  (Chalkley grid area 0.041 mm<sup>2</sup>). The Chalkley count (CC) was obtained by finding the mean value of three graticule counts. Specimens with adjacent non-neoplastic skin that exhibited sufficient stroma for the evaluation of vascular hot spots were also studied. Therefore, we analyzed 28 slides: eight from skin adjacent to SK, ten from siSCC, and ten from iSCC.

### Statistical analysis

The data were tested using Winstat 3.1 software (Kalmia Company Inc, Cambridge, USA). T-test dependent and analysis of variance (ANOVA) were used to evaluate differences between groups.

## RESULTS

Whereas the CD105 Chalkley count significantly increased with CSCC progression from SK to iSCC (ANOVA, P=0.006) (Figures 1 and 2), the CD34 Chalkley count was not correlated with tumor stage (ANOVA, P=0.55). In addition, the CD34 and CD105 Chalkley counts of the advancing tumor fronts were significantly higher than those of the respective adjacent non-neoplastic tissue (P values in Table 1). When the Chalkley counts of adjacent non-neoplastic tissue were compared between the groups, no significant differences were found for either the CD34 (P=0.44) or CD105 (P=0.89) immunomarkers.

Endothelial cell immunoreactivity for CD105 was positive in 28.6% (eight) of 28 adjacent non-neoplastic tissue samples and 78.7% (70) of 89 tumor lesions. For CD34, these rates were 96.4% and 100%, respectively.

## DISCUSSION

There is an ongoing debate over the malignant nature of SK.<sup>2,14-16</sup> It has been estimated that 10% of SKs invade the dermis.<sup>14</sup> The tendency to spread, the lethal potential of untreated lesions and the full CSCC histopathological criteria found in SK make considering SK a type of *in situ* CSCC reasonable.<sup>2</sup> Understanding the pathophysiology of

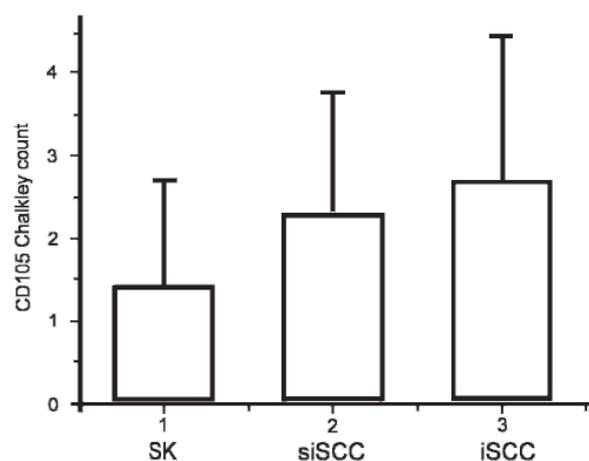


Figure 1 - CD105 mean Chalkley counts for solar keratosis (SK), superficially invasive squamous cell carcinoma (siSCC) and invasive squamous cell carcinoma (iSCC).

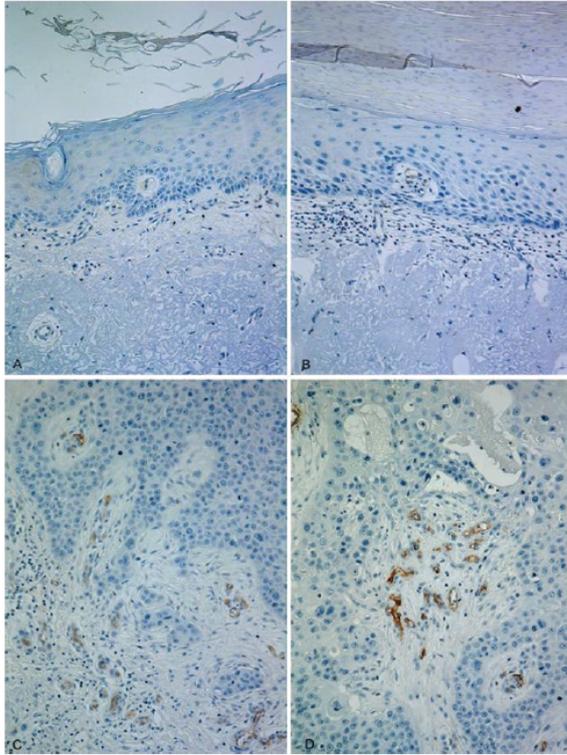


Figure 2 - Vascular hot spots in CD105-stained adjacent non-neoplastic skin (A), SK (B), siSCC (C), and iSCC (D).

carcinogenesis is crucial for developing therapies for and preventing complications of this common neoplasm.

After centuries of observation and research, the vascular bed of tumors is still an area of interest due to its role in malignancy progression. Several mechanisms are responsible for tumor blood supply, including angiogenesis. The angiogenic theory supports the possibility that tumor cells can elicit growth of new capillary endothelium. A positive balance between angiogenesis inducers and countervailing inhibitors activates the "angiogenic switch," the transformation of a quiescent vascular bed into a proliferating one.<sup>5</sup>

The quantification of vasculature in human tumors began in 1991, when vessels were immunohistochemically high-

Table 1 - Mean CD34 and CD105 Chalkley counts in stroma from tumor fronts and adjacent non-neoplastic skin.

	CD34 CC			CD105 CC		
	Adjacent skin	Tumor front	P	Adjacent skin	Tumor front	P
SK	1.91	3.25	0.049	0.08	1.66	0.046
siSCC	2.06	3.50	0.016	0.36	2.46	0.0008
iSCC	2.16	3.96	0.028	0.46	3.73	0.001

CC: mean Chalkley count, SK: solar keratosis, siSCC: superficially invasive squamous cell carcinoma, iSCC: invasive squamous cell carcinoma. Differences between tumor front and adjacent skin were evaluated by T-test dependent.

lighted with antibodies to factor VIII-related antigen.<sup>11</sup> Since then, several immunohistochemical markers have been used to stain and study vessels.<sup>6,14</sup> However, panendothelial markers, such as CD34, CD31, factor VIII and von Willebrand factor, do not distinguish between small and large vessels.<sup>17</sup> One alternative to panendothelial markers is CD105, which is over-expressed in proliferating endothelial cells and is strongly up-regulated in the endothelium of various neoplastic tissues compared with normal ones.<sup>8-10,18</sup> Our results reinforced the neoangiogenic character of this marker because CD105 expression was less evident in vessels from chronic sun-damaged adjacent non-neoplastic tissue (28.6%) than in those from the tumor front (78.7%) (Figure 2), in contrast to the indiscriminate immunoreactivity found in CD34 samples.

Among the different techniques used for the immunohistochemical study of angiogenesis, we chose the Chalkley method because it is considered to be the most accurate.<sup>6,12</sup> Specifically, the Chalkley method abolishes the observer-dependent judgment in quantifying adjoining immunostained structures, such as deciding whether a vessel is vessel single or two distinct blood vessels.<sup>13</sup> Whereas early CSCC cells distribute parallel to the epidermis, the developed CSCC cells spread out through the dermis, and vessels accompany the tumor architecture. Because the Chalkley method considers intersecting points within the circumferential area of the ocular, the distribution of the structures influences the count. Of the magnifications normally used (200, 250 and 400×),<sup>6,18</sup> we considered it more reliable to use the highest (400×) so that vessels from different groups could be distributed in the circumference.

In this study, vessels were assessed in the stroma of the tumor front, regardless of whether they were intra- or peritumoral, because islands of desmoplasia and angiogenesis are created at sites where multiple cutaneous carcinoma protrusions invade the dermis.

Angiogenesis can be activated at different stages of tumor progression.<sup>4</sup> For example, Smith-McCune *et al.* studied the multi-stage progression of invasive CSCC in transgenic mice and concluded that the angiogenic switch occurs during the premalignant stages of tumorigenesis.<sup>19</sup> In addition, Coussen *et al.* proposed that the disruption of the stromal architecture in the dermis at the dysplastic stage could be related to the release of matrix-bound heparin-binding growth factors and the consequent activation of angiogenesis.<sup>20</sup>

The data regarding human CSCC are controversial in part because researchers evaluate angiogenesis in different ways. For example, Strieth *et al.* analyzed mean vascular density in CD31-immunostained vessels from normal skin, SK, hypertrophic SK, and early- and late-stage CSCC samples via computer-assisted imagery.<sup>21</sup> Only late stage CSCCs exhibited a significant increase in vascularization using this method. In contrast, Nijsten *et al.* compared maximum and mean CD34 Chalkley counts in vascular hot spots of normal skin, SK and iSCC and found significantly higher counts in both SK and iSCC than in normal skin.<sup>22</sup> This group also studied the active angiogenesis rate through the endothelial cell proliferation (ECP) fraction using double labeling of Ki-67/CD34 endothelial cells. The ECP was found to be significantly increased and was parallel to CSCC progression.<sup>22</sup>

The present study showed that the angiogenic switch occurs early in the development of CSCC, which was demonstrated using both panendothelial and neoangiogenesis markers.

Using the panendothelial CD34 stain, no differences were found in the microvascular area between the different stages of CSCC. However, the CD105 stain revealed an induction of newly formed vessels that accompany the progression of CSCC. Therefore, Nijsten's data<sup>22</sup> were corroborated by our findings, which emphasizes the necessity of assessing tumor angiogenesis through active angiogenesis markers (ECP and CD105).

It has been proposed that angiogenesis onset occurs not only for metabolic supply but also for the establishment of invasion pathways by producing proteases and/or for guiding tumor cells.<sup>4,21</sup> Because SKs are limited lesions, angiogenesis induction in this stage supports their invasive carcinomatous behavior.

A lower MVD has been found in neoplastic tissue in glioblastomas and renal, colon and mammary carcinomas compared with their respective normal tissues.<sup>5</sup> As a result, Eberhard *et al.* and Hlatky *et al.* have suggested that techniques for assessing microvessel density using pan-endothelial markers estimate the vascular bed amount of a tissue but not the angiogenic status, that is, the rate of evolving neovasculature.<sup>5,23</sup> Because neo-angiogenesis markers allow the dynamic evaluation of tumor-dependent angiogenesis, they should be considered for assessing angiogenic status in the future.

## CONCLUSION

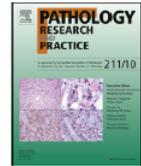
The dependence of skin carcinogenesis on angiogenesis demonstrated in this study is useful for understanding CSCC evolution and metastatic dissemination and for the development of new therapeutic strategies, such as anti-angiogenic therapies, that specifically target CD105.

## ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by FAPESP (Sao Paulo Research Foundation), CNPq (National Council of Technological and Scientific Development) and the Department of Dermatology at the University of Wuerzburg, Germany. We are grateful to Adilson Abilio Piazza, Ana Claudia Piazza, and Lidia Marília Frey for technical support. Konradin Metzke is a researcher of CNPq.

## REFERENCES

- Diepgen TL, Mahler V. The Epidemiology of Skin Cancer. *Br J Dermatol.* 2002;146(suppl 61):1-6, doi: 10.1046/j.1365-2133.146.s61.2.x.
- Ackerman AB, Mones JM. Solar (actinic) Keratosis is Squamous Cell Carcinoma. *Br J Dermatol.* 2006;155:9-22, doi: 10.1111/j.1365-2133.2005.07121.x.
- Hanahan D, Weinberg A. The Hallmarks of Cancer. *Cell* 2000;100:57-70, doi: 10.1016/S0092-8674(00)81683-9.
- Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the Angiogenic Switch. *Nat Rev Cancer.* 2003;3:401-10, doi: 10.1038/nrc1093.
- Hanahan D, Folkman J. Patterns and Emerging Mechanisms of the Angiogenic Switch during Tumorigenesis. *Cell.* 1996;86:353-64, doi: 10.1016/S0092-8674(00)80108-7.
- Sharma S, Sharma MC, Sarkar C. Morphology of Angiogenesis in Human Cancer: A Conceptual Overview, Histoprognostic Perspective and Significance of Neovascularization. *Histopathology.* 2005;46:481-9, doi: 10.1111/j.1365-2559.2005.02142.x.
- Eberhard A, Kahlert S, Goede V, Hemmerlein B, Plate KH, Augustin HG. Heterogeneity of Angiogenesis and Blood Vessel Maturation in Human Tumors: Implications for Antiangiogenic Tumor Therapies. *Cancer Res.* 2000;60:1388-93.
- Fonsatti E, Altomonte M, Nicotra MR, Natali PG, Maio M. Endoglin (CD105): a powerful therapeutic target on tumor-associated angiogenic blood vessels. *Oncogene* 2003;22:6557-63, doi: 10.1038/sj.onc.1206813.
- Fonsatti E, Del Vecchio L, Altomonte M, Sigalotti L, Nicotra MR, Coral S, et al. Endoglin: An Accessory Component of the TGF- $\beta$ -Binding Receptor-Complex With Diagnostic, Prognostic, and Bioimmunotherapeutic Potential in Human Malignancies *J Cell Physiol.* 2001;188:1-7.
- Minhajati R, Mori D, Yamasaki F, Sugita Y, Satoh T, Tokunaga O. Organ-specific endoglin (CD105) expression in the angiogenesis of human cancers. *Pathol Int.* 2006;56:717-23, doi: 10.1111/j.1440-1827.2006.02037.x.
- Fox SB and Harris AL. Histological Quantitation of Tumour Angiogenesis. *APMIS.* 2004;112:413-30, doi: 10.1111/j.1600-0463.2004.apm11207-0803.x.
- Vermeulen PB, Gasparini G, Fox SB, Colpaert C, Marson LP, Gion M. Second International Consensus on the Methodology and Criteria of Evaluation of Angiogenesis Quantification in Solid Human Tumors. *Eur J Cancer.* 2002;38:1564-79.
- Hansen S, Sorensen FB, Vach W, Grabau DA, Bak M, Rose C. Microvessel Density Compared with the Chalkley Count in a Prognostic Study of Angiogenesis in Breast Cancer Patients. *Histopathology.* 2004;44:428-36, doi: 10.1111/j.1365-2559.2004.01848.x.
- Glogau RG. The risk of progression to invasive disease. *J Am Acad Dermatol.* 2000;42:523-4, doi: 10.1067/mjd.2000.103339.
- Lee AD, Jorizzo JL. Optimizing Management of Actinic Keratosis and Photodamaged Skin: Utilizing a Stepwise Approach. *Cutis.* 2009;84:169-75.
- Fuchs A, Marmur E. The Kinetics of Skin Cancer: Progression of Actinic Keratosis to Squamous Cell Carcinoma. *Dermatol Surg.* 2007;33:1099-101, doi: 10.1111/j.1524-4725.2007.33224.x.
- Hasan J, Byers R, Jayson GC. Intra-tumoural Microvessel Density in Human Solid Tumours. *Br J Cancer.* 2002;86:1566-77.
- Bluff JE, Menakuru SR, Cross SS, Higham SE, Balasubramanian SP, Brown NJ, et al. Angiogenesis is Associated With the Onset of Hyperplasia in Human Ductal Breast Disease. *Br J Cancer.* 2009;101:666-72.
- Smith-McCune K, Zhu Y-H, Hanahan D, Arbeit J. Cross-species Comparison of Angiogenesis during the Premalignant Stages of Squamous Carcinogenesis in the Human Cervix and K14-HPV16 Transgenic Mice. *Cancer Res.* 1997;57:1294-300.
- Coussens LM, Hanahan D, Arbeit JM. Genetic Predisposition and Parameters of Malignant Progression in K14-HPV 16 Transgenic Mice. *Am J Pathol.* 1996;149:1899-1917.
- Strieth S, Hartschuh W, Pilz L, Fusenig NE. Angiogenic Switch Occurs Late in Squamous Cell Carcinomas of Human Skin. *Br J Cancer.* 2000;82:591-600.
- 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, doi: 10.1111/j.1365-2133.2004.06214.x.
- Hlatky L, Hahnfeldt P, Folkman J. Clinical Application of Antiangiogenic Therapy: Microvessel Density, What it Does and Doesn't Tell Us. *J Natl Cancer Inst.* 2002;94:883-93.



## Original Article

## p53 immunoexpression in stepwise progression of cutaneous squamous cell carcinoma and correlation with angiogenesis and cellular proliferation



Michelle Etienne Baptistella Florence<sup>a,\*</sup>, Juliana Yumi Massuda<sup>a</sup>,  
Tânia Cristina Benetti Soares<sup>b</sup>, Rafael Fantelli Stelini<sup>b</sup>, Lidia Marilia Poppe<sup>c</sup>,  
Eva-Bettina Bröcker<sup>c</sup>, Konradin Metzke<sup>b</sup>, Maria Leticia Cintra<sup>b</sup>, Elemir Macedo de Souza<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Internal Medicine, University of Campinas, Rua Tessália Vieira de Camargo, 126 – Campinas, São Paulo 13083-887, Brazil

<sup>b</sup> Department of Pathology, University of Campinas, Rua Tessália Vieira de Camargo, 126 – Campinas, São Paulo 13083-887, Brazil

<sup>c</sup> Department of Dermatology, University of Würzburg, Josef-Schneider-Strasse 2 Haus D8, 97080 Würzburg, Germany

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 3 March 2015

Received in revised form 5 June 2015

Accepted 13 July 2015

## Keywords:

Carcinogenesis  
Tumor suppressor gene  
Squamous cell carcinoma  
Solar keratosis  
Ki67  
CD105

## ABSTRACT

Multistep carcinogenesis involves loss of function of tumor suppressor proteins such as p53 and induction of angiogenesis. Such mechanisms contribute to cutaneous squamous cell carcinoma progression and may be interconnected.

We aimed to explore p53 immunoexpression in spectral stages of cutaneous squamous cell carcinoma and correlate expression to both neovascularization and cellular proliferation.

We estimated the percentages of immunostained cells for p53 and Ki67 (proliferation marker) in three groups: 23 solar keratoses, 28 superficially invasive squamous cell carcinomas and 28 invasive squamous cell carcinomas. The Chalkley method was used to quantify the microvascular area by neovascularization (CD105) immunomarker in each group.

There was no significant difference for rate of p53- and Ki67-positive cells between groups. Significant positive correlation was found between the CD105 microvascular area and the rate of p53 positive cells in superficially invasive squamous cell carcinoma as well as between the rate of p53- and Ki67-positive cells in invasive squamous cell carcinoma.

p53 and Ki67 immunoexpression did not increase with cutaneous squamous cell carcinoma progression. Neovascularization in the initial stage of invasion and proliferative activity in the frankly invasive stage were both associated with p53 immunoexpression. Loss of p53 tumor suppressor function through progressive steps may be directly involved in skin carcinogenesis.

© 2015 Elsevier GmbH. All rights reserved.

## 1. Introduction

Nonmelanoma skin cancer (NMSC) has significantly increased worldwide in recent decades [1–4]. Ultraviolet radiation (UVR)

exposure is probably the main environmental risk factor for this increment [5]. The so-called guardian of genome is a 53-kDa protein (p53), encoded by p53 tumor suppressor gene (tumor protein 53 gene – TP53). As a transcriptional factor, p53 crucially inhibits malignancies in many tissues through cell-cycle arrest, DNA repair, apoptosis and suppression of angiogenesis (new capillary blood vessels formation) [6]. The UVR participation in skin carcinogenesis is explained by UVR-induced damage in DNA (signature or fingertip mutation), which is frequently detected in TP53 from cutaneous squamous cell carcinoma (CSCC), a phenomenon not found in internal tumors [7].

CSCC would be the most prevalent malignancy among fair-skinned people if solar keratosis (SK) were epidemiologically regarded as the *in situ* form. Indeed the squamous cell carcinoma (SCC) of solar keratotic type is a continuum comprising spectral stages, from subtle SK to frankly invasive counterpart [8]. A

**Abbreviations:** BA11, brain-specific angiogenesis inhibitor 1; bFGF, basic fibroblast growth factor; bFGF-BP, bFGF-binding protein; CC, Chalkley count; CD105, endoglin; COX-2, cyclooxygenase-2; CSCC, cutaneous squamous cell carcinoma; HIF1 $\alpha$ , hypoxia inducible factor 1 $\alpha$ ; iSCC, invasive squamous cell carcinoma; Ki67, Ki67 protein; LI, labeling index; MVD, microvascular density; NMSC, nonmelanoma skin cancer; p53, tumor protein p53; PCNA, proliferating cell nuclear antigen; SCC, squamous cell carcinoma; SK, solar keratosis; siSCC, superficially invasive squamous cell carcinoma; TGF- $\beta$ , transforming growth factor  $\beta$ ; TP53, tumor protein 53 gene; TSP1, thrombospondin-1; UVR, ultraviolet radiation; vWf, von Willebrand factor.

\* Corresponding author.

E-mail address: [etiennefflorence@yahoo.com.br](mailto:etiennefflorence@yahoo.com.br) (M.E.B. Florence).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.prp.2015.07.006>

0344-0338/© 2015 Elsevier GmbH. All rights reserved.

multistep carcinogenesis process occurs in the development of CSCC, with defined stages involving different genetic alterations and signal pathways [9]. Loss of function of tumor suppressor genes and induction of angiogenesis are both important events in tumor progression [9] and may be interconnected in CSCC.

Immunohistochemical expression of p53 is still a matter of discussion in CSCC. p53 overexpression may be related to the presence of either the wild-type or mutated protein, since both may accumulate in the nucleus. Interestingly, such phenomenon is precocious in chronic sun-exposed skin and precedes genomic instability [10–13]. Moreover, p53 expression is related to the proliferative status of keratinocyte [14] and may illustrate the role of protein in the pathogenesis of CSCC.

Blood vessels support tumor expansion both metabolically and structurally while under dynamic stimulation. Angiogenesis is an early event [15–17] and progresses with CSCC stages [16,17]. Tumor angiogenesis may be properly assessed through endoglin (CD105) expression, a glycoprotein highly expressed in neofomed vessels [18,19]. Once defective-controlling mechanisms of cellular growth and differentiation result in proliferation of tumoral cells, Ki67, a protein detectable in dividing cells, becomes another useful marker related to tumorigenesis.

The aim of this study was to compare the immunohistochemical expression of p53 and Ki67 between different stages of CSCC. Additionally, the relationship between p53 expression and both neovascularization and proliferation of CSCC is addressed, through CD105 microvessel count and Ki67 expression, respectively.

## 2. Materials and methods

Specimens of cutaneous SCC and SK were retrospectively searched in the files of the Department of Pathology, Faculty of Medical Sciences, University of Campinas (UNICAMP), from 2001 to 2008. Only tumors growing on the dorsum of forearms, wrists or hands were selected because these are anatomical sites of heavy sun exposure. Thirty-six percent of lesions with features of hyperkeratotic SK, measuring less than 1 cm in diameter, at these locations, were demonstrated, by histological analysis, to be invasive SCC [20]. This clinical–pathological continuum makes upper limbs a convenient site for further study. The hematoxylin–eosin stained serial sections were reviewed and lesions were divided into 3 groups: (1) the *in situ* form, to wit, solar keratosis (SK); (2) superficially invasive squamous cell carcinoma (siSCC); and (3) invasive squamous cell carcinoma (iSCC). siSCC group included neoplasms filling the papillary dermis, and iSCC those that penetrated the medium/deep reticular dermis. The stimulus for angiogenesis is broad as injury, ulceration, bacterial colonization and the repair pathway could all participate in addition to the stimulus from mutations linked to the tumor. In this way, as this analysis was comparative, we took care to select specimens that were uniform regarding cell type and histological grade, showing no signs of ulceration.

Exclusion criteria were: tumors in patients with albinism, arsenicism, xeroderma pigmentosum, any kind of immunosuppression, or those submitted to previous radiotherapy and lesions with histologically questionable diagnoses. Ninety cases from different patients, with enough material for new sections, were randomly selected, comprising thirty for each group. Nine cases were excluded due to inappropriate immunohistochemical reactions for p53, three for Ki67 and one for CD105. Finally, remained, within SK, siSCC and iSCC groups, respectively, 23, 28 and 28 samples.

This study was approved by the Research Ethics Committee of the State University of Campinas.

### 2.1. Immunohistochemical staining

The immunohistochemical expression of p53 and Ki67 was evaluated in each stage of CSCC and correlated one to another and to CD105-microvessel count.

The primary antibodies used for tumor cells studies were p53 (DO-7; DAKO) at a dilution of 1:25 and Ki67 (MIB-1; DAKO) at a dilution of 1:75. The sections were incubated for 25 min at room temperature. Epitope retrieval was obtained using a steamer with Tris-EDTA buffer.

CD105 (SN6h; DAKO) was the primary antibody for vessels study at a dilution of 1:10. The sections were incubated for 12 h at room temperature. Antigen retrieval was obtained using 0.4% pepsin at 37 °C for 30 min and sections were also submitted to serum-free protein blocks (DAKO) at 37 °C.

The EnVision Plus polymer (DAKO) was used as a reaction amplifier.

Immunoreactivity was considered positive for p53 and Ki67 when nuclear staining in keratinocytes was found (Fig. A) and for CD105 when a membrane pattern in endothelial cells was achieved (Fig. B). Presence of nuclear staining for p53 and Ki67 within non-neoplastic epithelial cells from tumor periphery was used as a positive internal control. Granulation tissue was included in each test for CD105 as a positive control. Negative control was obtained by omitting the primary antibodies.

### 2.2. p53 and Ki67 quantification

Within tumor tissue, 1024 × 768 pixels digital images were taken from random 400× fields, using a Nikon Eclipse E200 CX30 microscope connected to a Canon PowerShot A630 camera. All positive and negative nuclei of neoplastic cells were counted with the aid of Imagelab 2000® (Image analysis system, 2000, Diracom, Sao Paulo, Brazil) until at least 500 tumor cells were included. The percentage of positive nuclei per total recorded nuclei was defined as labeling index (LI) for each marker (p53LI and Ki67LI).

The reaction was considered inappropriate and the case excluded when cells from the entire section were not marked for p53 and Ki67. If no tumor cell was immunostained within the tumor zone or within the random fields, the case was considered negative.

### 2.3. Microvessel density quantification

CD105-stained histological sections were blindly scanned at ×100 magnification to identify the areas of the stroma with the highest microvessel profiles, called 'hot spots'. Three 'hot spots' were examined in tumor fronts, i.e., in the boundary stroma from neoplastic areas in the three groups, using a 25-point Chalkley eyepiece grid (Leitz Orthoplan; Leica) [21,22]. One ×400 field, corresponding to an area of 0.1449 mm<sup>2</sup>, was chosen within each 'hot spot'. The grid was positioned in such way as to permit immunostained vessels to hit on the maximum number of points. The final CD105 Chalkley count (CC) for an individual specimen was taken as the mean value of the three grid counts. This has been considered to be an indirect estimation of microvascular area [21] and a reproducible method for immunohistochemical evaluation of angiogenesis [23,24].

### 2.4. Statistical analysis

Comparison of p53LI and Ki67LI between groups was conducted using the non-parametrical Kruskal–Wallis test. Spearman's correlation test was run to determine the relationship of p53LI to both CD105CC and Ki67LI.

### 3. Results

There were no significant differences between groups for p53LI (mean p53LI was 24.6%, 22.3%, and 26% for SK, siSCC, and iSCC, respectively;  $p=0.956$ ) and Ki67LI (mean Ki67LI was 12%, 13.8%, and 15.7% for SK, siSCC, and iSCC respectively;  $p=0.943$ ).

Significant positive correlation was found between p53LI and CD105CC ( $R=0.394$ ;  $p=0.038$ ) in siSCC (Fig. C). No correlation between these markers was observed in the SK and iSCC groups.

Significant positive correlation was found between p53 and Ki67 labeling indices ( $R=0.533$ ;  $p=0.0034$ ) in iSCC (Fig. D). No correlation between these markers was observed in the SK and siSCC groups.

### 4. Discussion

The role of p53 in genoma protection makes TP53 the crucial target for accumulation of mutations and consequent disturbance in preventing cancer. Cell cycle arrest for DNA repair and apoptosis are the main mechanisms by which p53 prevents genome alterations from being transmitted to progeny. TP53 also controls angiogenesis [25]. As recently proposed keratinocytes may have defensive pathways to counterbalance TP53 mutation, to wit mitosis slippage, cell differentiation and shedding. In that sense an additional step would be necessary to allow p53 mutated cells to escape the proliferative block, divide and originate malignant clones [26]. Thus, mutation of a single gene such as TP53 may contribute to stepwise carcinogenesis in multifaceted ways.

Under certain physiological conditions, the short half-life through rapid degradation of wild p53 makes it undetectable in immunohistochemical assays. Conversely, both wild and mutated p53 may reach the threshold for immunohistochemical detection, the wild form as a repair response for genotoxic damage, e.g. UVR insult [27], and the mutated one by having half-life prolonged after stabilization and accumulation into the nucleus [28,29]. Clonal antibodies commonly used in immunohistochemistry detect both wild type and mutated protein and may have different sensitivity profiles [10]. Interestingly some authors identified loss of p53 immunoreactivity once cell became differentiated, in spite of maintaining TP53 mutation [11].

The definition of the threshold for determining p53 immunoreactivity as positive, including any nuclear staining or the arbitrary percentage of 5%, 10%, 15% and 30% of staining cells, differs among authors [10,30]. Therefore, interpretation as positive or negative is disputable. Likewise, the frequency of p53 positivity has varied among studies, from 0% to 100% in SCC, 0% to 80% in Bowen's disease, and 0% to 100% in SK [10,31,32]. Percentage of immunostained cells has been estimated by different semi-quantitative and quantitative techniques. Parameters chosen in some studies [14,33–35], including ours (percentage of immunostained cells per total tumor cells in randomly selected fields with a minimum number of cells included) are aleatory and comparative. In addition, dichotomization is avoided by considering immunomarkers as continuous variables.

Several authors have evaluated the immunoreactivity of p53 according to evolutive stages of sun-induced lesions [10,12,31,32,36–38]. Some have found increasing rates of p53 staining keratinocytes in skin samples ranging from normal to chronic sun-exposed skin and SK [10,12,31], and from SK to invasive SCC [32,36]. Such studies, therefore, provide molecular clues for the comprehension of carcinogenesis in sun-exposed skin as a gradual process.

Some studies, however, obtained higher expressions in SK when compared to SCC [10,37,38]. Remarkably, in the present study there was no significant difference in p53LI among three different stages,

from in situ to fully invasive one. Indeed, cumulative effects of UVR on p53 may induce either wild type or mutant p53 protein. It would even be possible to have a high p53 expression in a neoplastic lesion due to the presence of both p53 proteins [10]. Barzilai et al. stated that there are two groups demonstrating p53 expression in CSCC; one of them, with higher levels, occurs on SK and SCC in sun-damaged skin [10]. Consequently, if truly sun-exposed skin is evaluated, as per current research, p53 immunoreactivity could fail to distinguish different stages.

It is a consensus in the scientific community that immunohistochemical expression of p53 is not a surrogate marker of TP53 mutation. Of note, immunoreactivity for p53 has not correlated with mutation of TP53 in skin cancer [37,39–41]. However, when Taguchi et al. compared only missense mutation and p53 overexpression, they found significant association [40]. Interestingly, Einsphar et al. identified correlation between TP53 mutation and positive p53 immunoreactivity, when the percentage of immunostained cells for p53 was above 23% [37]. Likewise, in ovary cancer there was strong correlation with TP53 mutation if over 60% of tumor cells were immunostained [42]. Further research is necessary to address this numeric relationship in CSCC.

Tumorigenesis depends conspicuously on stroma, which also contributes to a great portion of neoplastic growth [43]. Numerous mediators coordinate the interaction between malignancy and angiogenesis. In 1994, Dameron noted that a lack of wild-type p53 in fibroblasts led to the loss of the anti-angiogenic protein thrombospondin-1 (TSP1), providing an angiogenic switch [44]. Under default activity due to mutation of TP53 in epithelial tumors, stroma could also become angiogenic [43]. p53 has proven to influence several angiogenic factors. Wild-type p53 transactivates gene encoding for angiogenesis inhibitors – TSP1 and brain-specific angiogenesis inhibitor 1 (BAI1), maspin; it leads to degradation of proangiogenic factors – hypoxia inducible factor 1 $\alpha$  (HIF1 $\alpha$ ); and it prevents encoding angiogenesis activators – cyclooxygenase-2 (COX-2), basic fibroblast growth factor (bFGF), and bFGF-binding protein (bFGF-BP) [25,45].

Among methods for vasculature quantification, Chalkley count and microvascular density (MVD) are traditionally used. MVD technique consists of counting distinguishable immunostained vessels in a number of 'hot spot' fields and obtaining the median per field. Several immunohistochemical markers have implemented such quantification, including panendothelial markers, such as CD31, CD34, factor VIII and von Willebrand factor (vWf), and the neoangiogenesis marker, CD105 [22]. By being an endothelial transmembrane protein, CD105 is a component of the receptor complex for transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) and is associated with proliferation and hypoxia [19].

Many authors have studied the relation between MVD and immunoreactivity for p53. Using panendothelial markers, MVD significantly correlates with p53 positivity in prostatic [46], breast [47] and gastrointestinal cancer [48–52]. However such correlation has not been found in gallbladder [53] and hepatocellular carcinoma [54]. Through CD105, no significant association between MVD and p53 has been detected in ovarian [55] and endometrial cancer [56]. All these authors, except Takahashi et al., used p53 as a dichotomized variable [52]. Such categorization could make the relationship between p53 and angiogenesis disappear, even with the neoangiogenesis marker. However, some of them demonstrated a positive correlation [46–52], indicating that this issue must be further investigated.

The significant positive correlation we found between p53LI and CD105CC in siSCC (Fig. C) points to a possible positive interference. Mutated p53 would stop exerting antiangiogenic activity in the early phase of dermal invasion as observed through CD105CC. Besides the well-known metabolic role of vascular bed for tumor growth, this relationship illustrates chemical signaling for

tumor invasion. We cannot state dogmatically that we have detected mutated p53. However, it could be a consistent physiopathological explanation. It must be emphasized that considering both p53 and CD105 as continuous variables may enhance the detection power of relationship between them. Although the correlation between p53 and CD105 was significantly positive, pairs of variables were widely distributed (Fig C). The coefficient of determination indicated that 15% of CD105CC was explained by p53LI. It has been established that neovascularization is already present in SK and persists in iSCC [16,17], though we did not find correlation between p53LI and CD105CC in these stages. We believe that this fact highlights the importance of p53 in a specific stage as antiangiogenic factor, elucidating rate-limiting steps in carcinogenesis and the related role of p53.

Deregulated tumor-associated chronic inflammatory process may trigger tumor development through several mechanisms, including genomic instability, resistance to apoptosis, and angiogenesis [57]. Wild p53 type potentially controls immune response in mice [58], otherwise, inflammation impaired p53 function through inactivation and mutation [59,60]. Notably there is a phase in which clinical infiltration and tenderness are present during CSCC evolution. Berhane et al. proposed that such inflamed transient step contributed to tumor progression and was accompanied by increased p53 immunoreexpression, when compared with the asymptomatic precursory lesions [61]. In this way, the lack of discrimination of wild and mutated p53 is a potential limiting factor of this study.

Nuclear antigen Ki67 is demonstrable during all replication phases of the cellular cycle and therefore frequently detectable in neoplastic proliferation. Cell proliferation, estimated by rate of Ki67-positive cells, is found to increase according to CSCC stages, from sun-exposed skin to SK [12], from normal skin to SCC [35] and from SK to iSCC [36]. However, some authors have found that Ki67 immunoreexpression is higher in SK when compared to SCC [62–64], suggesting that Ki67 immunoreexpression may not differentiate degree of CSCC malignancy. Interestingly, in the current study there were no significant differences in Ki67LI between groups.

Freije et al. demonstrated a self-protective mechanism in cells harboring p53 inactivation. Mitosis slippage, cell differentiation and shedding via oncogene-induced differentiation pathway impair clonal capacity of p53 mutated cells. Applying the theory for CSCC, authors believe that a new event would be responsible for bypassing such mitosis block. Thus, cells would accumulate DNA damage leading to high genomic instability and emergence of malignant clones [26]. p53 immunoreexpression is frequently more prominent in CSCC periphery with gradual loss of staining as cells differentiate [14], even keeping p53 mutation [11]. Oram et al. suggested that p53 overexpression is related to the proliferative status of cells [14]. Altogether these findings could indicate that oncogene-induced differentiation pathway is indeed temporally inhibited in CSCC. Malignant cells expressing p53 would be in the proliferative compartment until differentiation was achieved

or not. Several authors have demonstrated positive correlation between p53 expression and proliferation rate depicted by Ki67 in SK [34], SCC [33,65], or both lesions [35,36] and also by proliferating cell nuclear antigen (PCNA), another immunomarker of proliferation, in SK and SCC [37]. Our results are consistent with such findings only in frankly invasive stage carcinoma (Fig. D). These results illustrate the possible similarity in biologic significance between p53 and Ki67 immunoreexpression. However, in the present study, there was no correlation between p53LI and Ki67LI in SK and siSCC. We propose that p53 immunoreexpression is related to the cell proliferative potential, however is dynamically different from true division. Proliferative potential may become cellular expansion as soon as propitious tissue conditions are established, to wit critical loss of p53 function and neovascularization.

We consider that the strengths of this study are as follows: the lesions were relatively uniform in morphology and anatomical location, in each group; to the best of our knowledge, the correlation of p53 staining with neovascularization measured by CD105 in siSCC has not been described in human CSCC. In contrast, there was not a related difference in degree of p53 and Ki67 staining at any stage of disease. Individual variations, depicted by the scatter diagram, indicate potential relationship between those pathological mechanisms of cancer progression, whereas interindividual analysis demonstrated through comparisons between groups evaluates general behavior, which cannot be particularly interconnected. On the other hand the small samples' size may have restricted the statistical test power and is a limitation of our study.

To sum up we hypothesize the p53-mediated evolution in carcinogenesis, namely proliferative activity occurs after neovascularization.

## 5. Conclusion

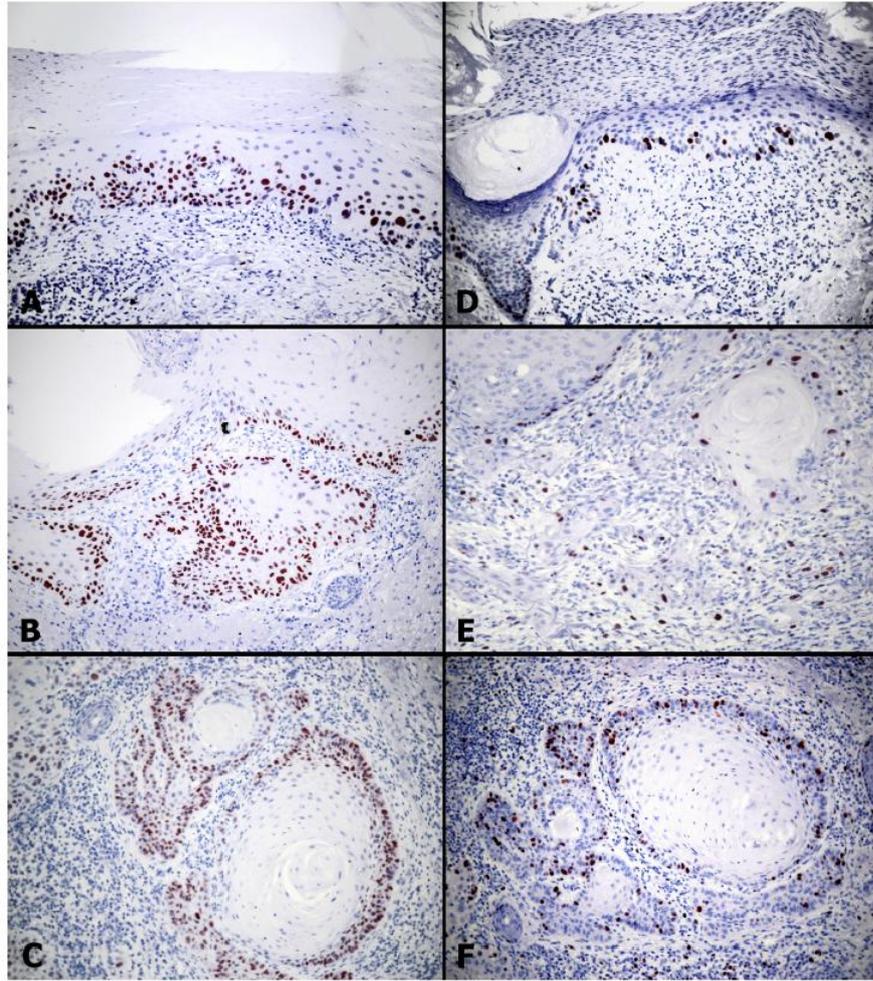
p53 and Ki67 immunoreexpression was not found to increase with CSCC progression from SK to iSCC. Neovascularization in the initial stage of invasion and proliferative activity in the frankly invasive stage were both associated with p53 immunoreexpression. Loss of p53 tumor suppressor function may be directly involved in evolving steps related to CSCC progression.

## Acknowledgements

This study was supported by FAPESP (Sao Paulo Research Foundation), CNPq (National Council of Technological and Scientific Development) and the Department of Dermatology at the University of Wuerzburg, Germany. We are grateful to Adilson Abilio Piazza, Ana Claudia Piazza. Konradin Metz is a researcher of CNPq.

## Appendix A.

See Fig. A1, Fig. B1, Fig. C1 and Fig. D1.



**Fig. A1.** p53 immunostaining in SK (solar keratosis) (A), siSCC (superficially invasive squamous cell carcinoma) (B) and iSCC (invasive squamous cell carcinoma) (C); Ki-67 immunostaining in SK (D), siSCC (E) and iSCC (F).

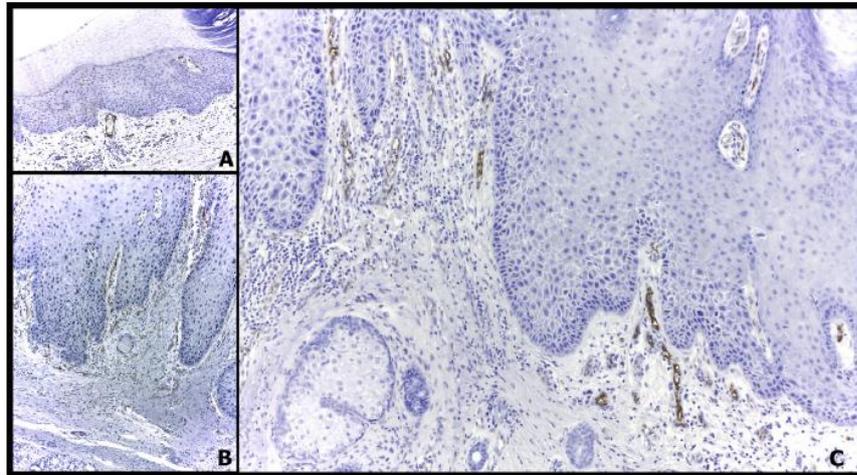


Fig. B1. CD105 immunostaining in SK (solar keratosis) (A), iSCC (invasive squamous cell carcinoma) (B) and siSCC (superficially invasive squamous cell carcinoma) (C).

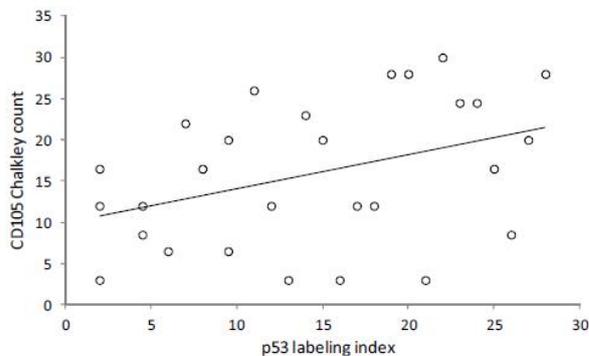


Fig. C1. Correlation between p53 labeling index and CD105 Chalkley count in superficially invasive squamous cell carcinoma.

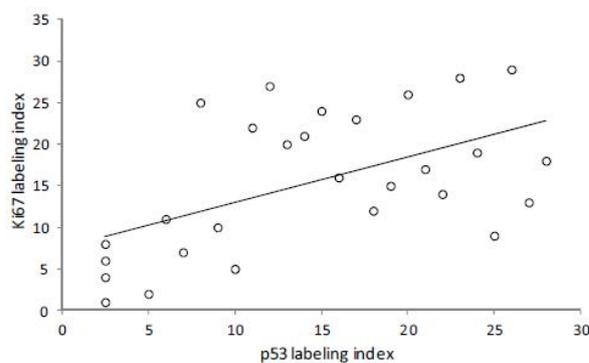


Fig. D1. Correlation between p53 and Ki67 labeling indices in invasive squamous cell carcinoma.

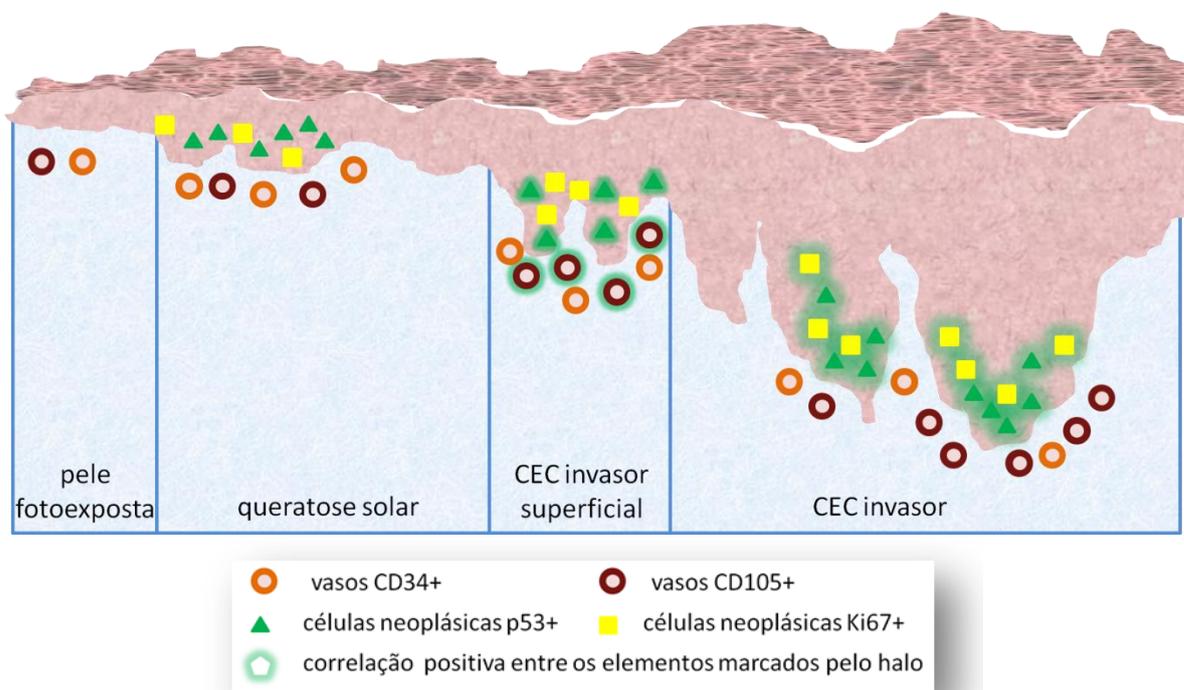
## References

- [1] M. Alam, D. Ratner, Cutaneous squamous-cell carcinoma, *N. Engl. J. Med.* 344 (2001) 975–983.
- [2] T. Diepgen, V. Mahler, The epidemiology of skin cancer, *Br. J. Dermatol.* 146 (2002) 1–6.
- [3] WHO available from <http://www.who.int/uv/faq/skincancer/en/index1.html> (last accessed on 02.03.15).
- [4] H.W. Rogers, M.A. Weinstock, A.R. Harris, M.R. Hinckley, S.R. Feldman, A.B. Fleischer, et al., Incidence estimate of nonmelanoma skin cancer in the United States, 2006, *Arch. Dermatol.* 146 (2010) 283–287.
- [5] M. Trakatelli, C. Ulrich, V. Del Marmol, S. Euvrard, E. Stockfleth, D. Abeni, Epidemiology of nonmelanoma skin cancer (NMSC) in Europe: accurate and comparable data are needed for effective public health monitoring and interventions, *Br. J. Dermatol.* 156 (2007) 1–7.
- [6] K.H. Vousden, D.P. Lane, p53 in health and disease, *Nat. Rev. Mol. Cell Bio.* 8 (2007) 275–283.
- [7] D.E. Brash, J.A. Rudolph, J.A. Simon, A. Lin, G.J. McKenna, H.P. Baden, et al., A role for sunlight in skin cancer: UV-induced p53 mutations in squamous cell carcinoma, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88 (1991) 10124–10128.
- [8] A. Ackerman, J. Mones, Solar (actinic) keratosis is squamous cell carcinoma, *Br. J. Dermatol.* 155 (2006) 9–22.
- [9] F. Potén, J. Lundeberg, A. Asplund, Principles of tumor biology and pathogenesis of BCCs and SCCs, in: J.L. Bolognia, J.L. Jorizzo, R.P. Rapini, J.P. Callen, T.D. Horn, A.J. Mancini, et al. (Eds.), *Dermatology*, 2nd ed., Elsevier, Mosby, 2008, pp. 1627–1639.
- [10] A. Barzilai, A. Lyakhovitsky, H. Trau, M. Fogel, M. Huszar, Expression of p53 in the evolution of squamous cell carcinoma: correlation with the histology of the lesion, *J. Am. Acad. Dermatol.* 57 (2007) 669–676.
- [11] Z. Ren, F. Pontén, M. Nistér, I. Pontén, Two distinct p53 immunohistochemical patterns in human squamous-cell skin cancer, precursors and normal epidermis, *Int. J. Cancer* 69 (1996) 174–179.
- [12] P.M. Carpenter, K.G. Linden, C.E. McLaren, K.T. Li, S. Arain, R.J. Barr, et al., Nuclear morphometry and molecular biomarkers of actinic keratosis, sun-damaged, and nonexposed skin, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 13 (2004) 1996–2002.
- [13] A.S. Jonason, S. Kunala, G.J. Price, R.J. Restifo, H.M. Spinelli, J.A. Persing, et al., Frequent clones of p53-mutated keratinocytes in normal human skin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93 (1996) 14025–14029.
- [14] Y. Oram, I. Orengo, S.C. Baer, T. Ocal, p53 protein expression in squamous cell carcinomas from sun-exposed and non-sun-exposed sites, *J. Am. Acad. Dermatol.* 31 (1994) 417–422.
- [15] K. Smith-McCune, Y.H. Zhu, D. Hanahan, J. Arbeit, Cross-species comparison of angiogenesis during the premalignant stages of squamous carcinogenesis in the human cervix and K14-HPV16 transgenic mice, *Cancer Res.* 57 (1997) 1294–1300.
- [16] T. Nijsten, C. Colpaert, P. Vermeulen, A. Harris, E. Van Marck, J. Lambert, 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.* 151 (2004) 837–845.
- [17] M.E.B. Florence, J.Y. Massuda, E. Bröcker, K. Metzke, M.L. Cintra, E.M. de Souza, Angiogenesis in the progression of cutaneous squamous cell carcinoma: an immunohistochemical study of endothelial markers, *Clinics* 66 (2011) 465–468.
- [18] R. Minhajat, D. Mori, F. Yamasaki, Y. Sugita, T. Satoh, O. Tokunaga, Endoglin (CD105) expression in angiogenesis of colon cancer: analysis using tissue microarrays and comparison with other endothelial markers, *Virchows Arch.* 448 (2006) 127–134.
- [19] E. Fonsatti, M. Altomonte, M.R. Nicotra, P.G. Natali, M. Maio, Endoglin (CD105): a powerful therapeutic target on tumor-associated angiogenic blood vessels, *Oncogene* 22 (2003) 6557–6563.

- [20] J.M. Suchniak, S. Baer, L.H. Goldberg, High rate of malignant transformation in hyperkeratotic actinic keratoses, *J. Am. Acad. Dermatol.* 37 (1997) 392–394.
- [21] S.B. Fox, A.L. Harris, Histological quantitation of tumour angiogenesis, *APMIS* 112 (2004) 413–430.
- [22] S. Sharma, M. Sharma, C. Sarkar, Morphology of angiogenesis in human cancer: a conceptual overview, histoprognotic perspective and significance of neoangiogenesis, *Histopathology* 46 (2005) 481–489.
- [23] P. Vermeulen, G. Gasparini, S. Fox, M. Toi, L. Martin, P. McCulloch, et al., Quantification of angiogenesis in solid human tumours: an international consensus on the methodology and criteria of evaluation, *Eur. J. Cancer* 32 (1996) 2474–2484.
- [24] S. Hansen, F. Sørensen, W. Vach, D. Grabau, M. Bak, C. Rose, Microvessel density compared with the Chalkley count in a prognostic study of angiogenesis in breast cancer patients, *Histopathology* 44 (2004) 428–436.
- [25] J.G. Teodoro, S.K. Evans, M.R. Green, Inhibition of tumor angiogenesis by p53: a new role for the guardian of the genome, *J. Mol. Med.* 85 (2007) 1175–1186.
- [26] A. Freije, R. Molinuevo, L. Ceballos, M. Cagigas, P. Alonso-Lecue, R. Rodriguez, et al., Inactivation of p53 in human heratinocytes leads to squamous differentiation and shedding via replication stress and mitotic slippage, *Cell Rep.* 9 (2014) 1349–1360.
- [27] P.A. Hall, P.H. McKee, H.D. Menage, R. Dover, D.P. Lane, High levels of p53 protein in UV-irradiated normal human skin, *Oncogene* 8 (1993) 203–207.
- [28] G.P. Pfeifer, A. Besaratinia, Mutational spectra of human cancer, *Hum. Genet.* 125 (2009) 493–506.
- [29] E.S. Abd-Elhamid, M.H. Elmalahy, Image cytometric analysis of p53 and mdm-2 expression in primary and recurrent mucocutaneous carcinoma of parotid gland: immunohistochemical study, *Diagn. Pathol.* 5 (2010) 72.
- [30] K. Metzke, Dichotomization of continuous data – a pitfall in prognostic factor studies, *Pathol. Res. Pract.* 204 (2008) 213–214.
- [31] J. Einspahr, D.S. Alberts, M. Aickin, K. Welch, P. Bozzo, T. Grogan, et al., Expression of p53 protein in actinic keratosis, adjacent, normal-appearing, and non-sun-exposed human skin, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 6 (1997) 583–587.
- [32] M.R. Hussein, Z.H. Al-Badaiwy, M.N. Guirguis, Analysis of p53 and bcl-2 protein expression in the non-tumorigenic, pretumorigenic, and tumorigenic keratinocytic hyperproliferative lesions, *J. Cutan. Pathol.* 31 (2004) 643–651.
- [33] T. Shimizu, M. Muto, T. Murakami, H. Furumoto, S. Mogami, C. Asagami, Overexpression of p53 protein associated with proliferative activity as evaluated by Ki-67 immunostaining in well-differentiated squamous cell carcinoma of the skin, *Dermatology* 195 (1997) 224–227.
- [34] T. Shimizu, A. Oga, T. Murakami, M. Muto, Overexpression of p53 protein associated with proliferative activity and histological degree of malignancy in solar keratosis, *Dermatology* 199 (1999) 113–118.
- [35] T. Batinac, G. Zamolo, N. Jonjic, F. Gruber, M. Petrovecki, p53 protein expression and cell proliferation in non-neoplastic and neoplastic proliferative skin disease, *Tumori* 90 (2004) 120–127.
- [36] R. Verdolini, P. Amerio, G. Goteri, L. Bugatti, G. Lucarini, B. Mannello, et al., Cutaneous carcinomas and preinvasive neoplastic lesions. Role of MMP-2 and MMP-9 metalloproteinases in neoplastic invasion and their relationship with proliferative activity and p53 expression, *J. Cutan. Pathol.* 28 (2001) 120–126.
- [37] J.G. Einspahr, D.S. Alberts, J.A. Wameke, P. Bozzo, J. Basye, T.M. Grogan, et al., Relationship of p53 mutations to epidermal cell proliferation and apoptosis in human UV-induced skin carcinogenesis, *Neoplasia* 1 (1999) 468–475.
- [38] D. Sakiz, T.T. Turkmenoglu, F. Kabukcuoglu, The expression of p63 and p53 in keratoacanthoma and intraepidermal and invasive neoplasms of the skin, *Pathol. Res. Pract.* 205 (2009) 589–594.
- [39] Y. Kubo, Y. Urano, K. Yoshimoto, H. Iwahana, K. Fukuhara, S. Arase, et al., p53 gene mutations in human skin cancers and precancerous lesions: comparison with immunohistochemical analysis, *J. Invest. Dermatol.* 102 (1994) 440–444.
- [40] M. Taguchi, S. Watanabe, K. Yashima, Y. Murakami, T. Sekiya, S. Ikeda, Aberrations of the tumor suppressor p53 gene and p53 protein in solar keratosis in human skin, *J. Invest. Dermatol.* 103 (1994) 500–503.
- [41] C. Campbell, A.G. Quinn, Y. Ro, B. Angus, J.L. Rees, p53 mutations are common and early events that precede tumor invasion in squamous cell neoplasia of the skin, *J. Invest. Dermatol.* 100 (1993) 746–748.
- [42] A. Yemelyanova, R. Vang, M. Kshirsagar, D. Lu, M.A. Marks, I.M. Shih, et al., Immunohistochemical staining patterns of p53 can serve as a surrogate marker for TP53 mutations in ovarian carcinoma: an immunohistochemical and nucleotide sequencing analysis, *Mod. Pathol.* 24 (2011) 1248–1253.
- [43] J. Bar, N. Moskovits, M. Oren, Involvement of stromal p53 in tumor-stroma interactions, in: *Seminars in Cell & Developmental Biology*, Elsevier, 2010.
- [44] K.M. Dameron, O.V. Volpert, M.A. Tainsky, N. Bouck, Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1, *Science* 265 (1994) 1582–1584.
- [45] N. Khromova, P. Kopnin, E. Stepanova, L. Agapova, B. Kopnin, p53 hot-spot mutants increase tumor vascularization via ROS-mediated activation of the HIF1/VEGF-A pathway, *Cancer Lett.* 276 (2009) 143–151.
- [46] E.Y. Yu, E. Yu, G.E. Meyer, M.K. Brawer, The relation of p53 protein nuclear accumulation and angiogenesis in human prostatic carcinoma, *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 1 (1997) 39–44.
- [47] G. Gasparini, A.L. Harris, Clinical importance of the determination of tumor angiogenesis in breast carcinoma: much more than a new prognostic tool, *J. Clin. Oncol.* 13 (1995) 765–782.
- [48] C. Fondevila, J. Metges, J. Fuster, J. Grau, A. Palacin, A. Castells, et al., p53 and VEGF expression are independent predictors of tumour recurrence and survival following curative resection of gastric cancer, *Br. J. Cancer* 90 (2004) 206–215.
- [49] J. Liang, K. Huang, A. Cheng, Y. Jeng, M. Wu, S. Wang, Clinicopathological and molecular biological features of colorectal cancer in patients less than 40 years of age, *Br. J. Surg.* 90 (2003) 205–214.
- [50] G. Perrone, B. Vincenzi, D. Santini, A. Verzi, G. Tonini, A. Vetrani, et al., Correlation of p53 and bcl-2 expression with vascular endothelial growth factor (VEGF), microvessel density (MVD) and clinic-pathological features in colon cancer, *Cancer Lett.* 208 (2004) 227–234.
- [51] S. Kang, K. Maeda, N. Onoda, Y. Chung, B. Nakata, Y. Nishiguchi, et al., Combined analysis of p53 and vascular endothelial growth factor expression in colorectal carcinoma for determination of tumor vascularity and liver metastasis, *Int. J. Cancer* 74 (1997) 502–507.
- [52] Y. Takahashi, C.D. Bucana, K.R. Cleary, L.M. Ellis, p53, vessel count, and vascular endothelial growth factor expression in human colon cancer, *Int. J. Cancer* 79 (1998) 34–38.
- [53] H. Kalekou, D. Miliaras, Immunohistochemical study of microvessel density, CD44 (standard form), p53 protein and c-erbB2 in gallbladder carcinoma, *J. Gastroenterol. Hepatol.* 19 (2004) 812–818.
- [54] P. Tseng, M. Tai, C. Huang, C. Wang, J. Lin, C. Hung, et al., Overexpression of VEGF is associated with positive p53 immunostaining in hepatocellular carcinoma (HCC) and adverse outcome of HCC patients, *J. Surg. Oncol.* 98 (2008) 349–357.
- [55] J.M. Rubatt, K.M. Darcy, A. Hutson, S.M. Bean, L.J. Havrilesky, L.A. Grace, et al., Independent prognostic relevance of microvessel density in advanced epithelial ovarian cancer and associations between CD31, CD105, p53 status, and angiogenic marker expression: a Gynecologic Oncology Group study, *Gynecol. Oncol.* 112 (2009) 469–474.
- [56] H.B. Salvanesen, M.G. Gulluoglu, I. Stefanosson, L.A. Akslen, Significance of CD 105 expression for tumour angiogenesis and prognosis in endometrial carcinomas, *APMIS* 111 (2003) 1011–1018.
- [57] G.B. Maru, K. Gandhi, A. Ramchandani, G. Kumar, The role of inflammation in skin cancer, in: B.B. Aggarwal, B. Sung, S.C. Gupta (Eds.), *Inflammation and Cancer*, 1st ed., Springer, Basel, 2014, pp. 437–469.
- [58] E.A. Komarova, V. Krivokrysenko, K. Wang, N. Neznanov, M.V. Chernov, P.G. Komarov, et al., p53 is a suppressor of inflammatory response in mice, *FASEB J.* 19 (2005) 1030–1032.
- [59] F. Colotta, P. Allavena, A. Sica, C. Garlanda, A. Mantovani, Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability, *Carcinogenesis* 30 (2009) 1073–1081.
- [60] P.J. Moos, K. Edes, F.A. Fitzpatrick, Inactivation of wild-type p53 tumor suppressor by electrophilic prostaglandins, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97 (2000) 9215–9220.
- [61] T. Berhane, G.M. Halliday, B. Cooke, R.S.C. Barnetson, Inflammation is associated with progression of actinic keratoses to squamous cell carcinomas in humans, *Br. J. Dermatol.* 146 (2002) 810–815.
- [62] H. Onodera, S. Nakamura, T. Sugai, Cell proliferation and p53 protein expression in cutaneous epithelial neoplasms, *Am. J. Dermatopathol.* 18 (1996) 580–588.
- [63] C. Tilli, F. Ramaekers, J. Broers, C. Hutchison, H. Neumann, Lamin expression in normal human skin, actinic keratosis, squamous cell carcinoma and basal cell carcinoma, *Br. J. Dermatol.* 148 (2003) 102–109.
- [64] S. Talghini, M. Halimi, H. Baybordi, Expression of P27, Ki67 and P53 in squamous cell carcinoma, actinic keratosis and Bowen disease, *Pak. J. Biol. Sci.* 12 (2009) 929–933.
- [65] A. Mansoor, P.H. McKee, J.A. Simpson, B. McGuire, C. Hobbs, Prognostic significance of Ki-67 and p53 immunoreactivity in cutaneous squamous cell carcinomas, *Am. J. Dermatopathol.* 18 (1996) 351–357.

## DISCUSSÃO GERAL

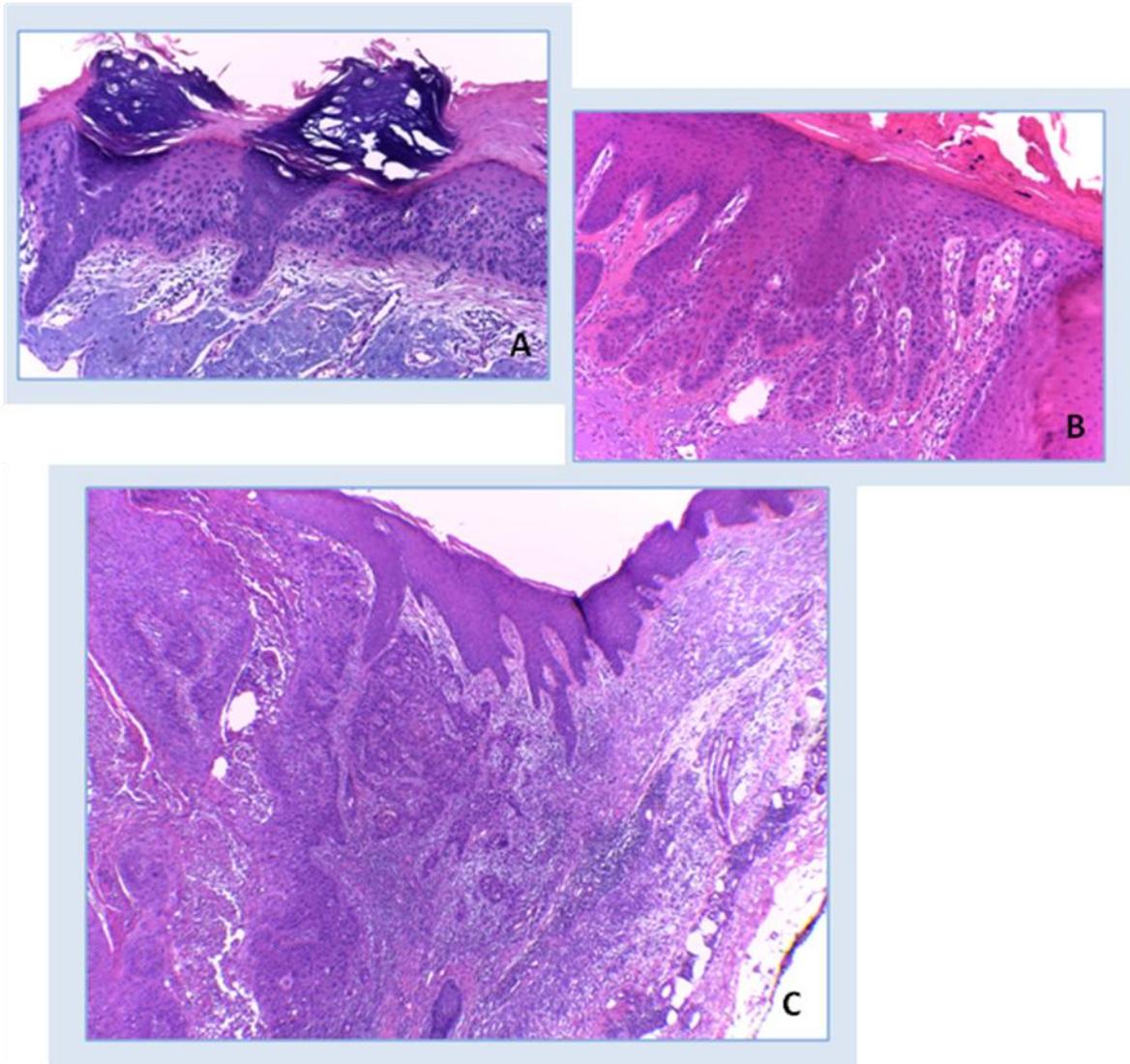
Os dados apresentados evidenciam que, no CECC, a indução de novos vasos ocorre na forma intraepidérmica e acompanha a progressão da neoplasia. A expressão IH da p53 associa-se à angiogênese na fase inicial da invasão e correlaciona-se à atividade proliferativa no estágio francamente invasor (Figura 5).



**Figura 5-** Sumário gráfico da avaliação imuno-histoquímica das proteínas p53 e Ki-67, e dos marcadores endoteliais CD34 e CD105 nos diversos estádios do carcinoma espinocelular cutâneo e pele adjacente.

O estudo da progressão tumoral baseia-se, parcialmente, na histopatologia da lesão<sup>21</sup>. Embora a carcinogênese, do ponto de vista teórico e experimental, seja apresentada, nos seus vários prismas, de forma fragmentada, não convém perder a noção do *continuum* que a caracteriza. A divisão em estádios, apesar de virtual, ajuda a delinear o comportamento tumoral e fornece elementos para compreensão global da fisiopatogenia.

A espessura e a profundidade de invasão são consideradas fatores histológicos prognósticos<sup>6</sup>. Os CECC do tronco e extremidades, em que a profundidade pode ser avaliada, recidivaram quando a metade inferior da derme estava acometida; e desenvolveram metástases, quando o subcutâneo foi atingido<sup>55</sup>. Dentre os tumores localizados nos antebraços e mãos, os que evoluíram com metástases, infiltravam a derme abaixo do nível dos glomérulos sudoríparos<sup>56</sup>. Optou-se, nesta pesquisa, por um sistema simples e reproduzível de classificação que amostrasse estádios evolutivos do CECC: forma intraepidérmica; forma superficialmente invasora, quando a neoplasia preenchia a derme papilar e atingia a reticular superficial; e a forma invasora, quando penetrava a derme reticular média e profunda (Figura 6).



[H&E, aumento original de 100x (A,B) e 40x (C)].

**Figura 6-** Estádios histológicos evolutivos do CECC: queratose solar **(A)**, CEC superficialmente invasor **(B)**, CEC invasor **(C)**

A expressão IH da p53 aumenta gradativamente com a exposição solar<sup>19</sup> e a superexpressão vem sendo estudada nas fases evolutivas do CECC<sup>26,27,36</sup>. Permanece controverso na literatura se há relação entre a taxa de positividade para a p53 e o grau de malignidade da lesão (revisado no Artigo 2). No ensaio apresentado, não houve diferença significativa entre os valores do IMp53, quando comparados os diversos estádios. Tais achados são esperados para a positividade da p53 e explicitam a uniformidade que a imunomarcção pode assumir nos tumores oriundos da pele fotoexposta, por expressarem os efeitos cumulativos

da RUV sobre a proteína<sup>27</sup>. A comparabilidade com os resultados da literatura convalida a técnica empregada para determinação do IMP53 - porcentagem de células positivas em campos aleatórios.

Os clones utilizados em diversos estudos IH não distinguem entre a p53 mutada e a selvagem<sup>27</sup>. Tampouco a positividade IH revelou-se um substituto para a pesquisa de mutação do TP53<sup>57,58,59</sup>. Por predominar o padrão compacto de núcleos positivos para a p53 (áreas contíguas de células imunomarcadas de forma homogênea)<sup>26</sup>, os tumores avaliados nesta pesquisa, potencialmente, refletem a multiplicação clonal de queratinócitos com mutação da p53.

Originalmente, acreditava-se que a angiogênese ocorreria após a invasão tumoral, entretanto há evidências crescentes de que a neovascularização é um evento precoce em neoplasias de diversos órgãos (revisado por Raica et al.)<sup>60</sup>. Em relação ao CECC, a angiogênese foi detectada nas lesões precursoras hiperplásicas dos modelos animais<sup>44,45,61</sup> e no estágio inicial (CEC intraepidérmico) da tumorigênese humana<sup>46</sup>. Tais achados foram corroborados no estudo atual: a área vascular (CC) foi significativamente maior na derme circunvizinha à QSo, em relação à do epitélio fotoexposto adjacente por meio do CD34 e do CD105.

O uso de marcadores pan-endoteliais para o estudo do vasculatura nos grupos evolutivos do CECC humano produziu resultados conflitantes. Não houve diferença na área vascular revelada pelo CD34 entre os grupos evolutivos nesta pesquisa; houve aumento do número de vasos marcados pelo CD31 somente no estágio invasor via morfometria computadorizada e manual<sup>50</sup>; e aumento, conforme a progressão tumoral, por meio da CC com o CD34<sup>46</sup>. O uso de marcadores de proliferação endotelial (ou de neoangiogênese) poderia facilitar a reprodutibilidade dos resultados. A área vascular aumentou conforme a progressão tumoral neste ensaio, evidenciada pelo CD105; e, a fração de proliferação endotelial (células endoteliais duplamente marcadas pelo Ki-67-CD34) teve incremento paralelo à evolução do CECC, segundo Nijsten et al.<sup>46</sup>.

O comportamento do leito vascular é dinâmico na evolução tumoral. O perfil angiogênico poderia indicar o fenótipo maligno celular antes mesmo da alteração da espessura epitelial e dos padrões de crescimento e diferenciação,

segundo dados obtidos a partir de clones tumorigênicos derivados de queratinócitos humanos transplantados em camundongos nus<sup>62</sup>. Entretanto, a densidade microvascular, avaliada com o uso de marcadores pan-endoteliais não reflete a atividade angiogênica em diversas neoplasias humanas, embora tenha valor prognóstico, de acordo com Eberhard et al. e Hlatky et al. (revisado no artigo 1)<sup>63,64</sup>. O uso de marcadores de neoangiogênese, como demonstrado pelo CD105 neste estudo, poderia particularizar o *status* angiogênico - vasculatura induzida pela neoplasia e relacionada ao comportamento biológico tumoral - e não, meramente, à demanda perfusional.

A determinação da área vascular pelo método Chalkley fornece uma estimativa da vascularização global do tumor. Houve concordância intra- e interobservador de moderada a substancial quando a CC foi usada para avaliar a angiogênese em CBC e CECC<sup>65</sup>. A aplicabilidade dos achados deste estudo consolida o uso da contagem de Chalkley e do marcador de neoangiogênese na pesquisa clínico-patológica.

A avaliação de parâmetros em conjunto, caso a caso, como nos estudos de correlação, delinea a inter-relação biológico-evolutiva. Tais dados são potencialmente interferentes. Neste estudo, constatou-se a correlação positiva e significativa do IMp53 com a CC-CD105 na fase inicial da invasão, ausente nos demais estádios. O coeficiente de determinação revelou que 15% da área microvascular aumentou conforme o incremento da expressão da p53 (revisado no Artigo 2). Ao considerarmos a imunodeteção da proteína mutada, tal achado revela que, em dado momento, a ausência da função da p53 faz-se crítica e contribui, entre outros fatores, para a indução de novos vasos. O fato de ter sido no estádio de invasão superficial do CECC cristaliza a importância fisiopatogênica da proteína, pois é sabido que os vasos atuam na sinalização química para a invasão neoplásica.

O traço maligno é também determinado pela perda do controle do crescimento tumoral, resultando na multiplicação das células tumorais<sup>29</sup>. O estudo da proliferação celular, incluindo marcadores como o Ki-67, tem tido propósitos diagnóstico e prognóstico na investigação das neoplasias humanas<sup>37</sup>. No CECC, a expressão do antígeno não foi identificada como fator prognóstico isolado<sup>66</sup>.

Os núcleos imunomarcados pelo Ki-67 estendem-se à porção média da epiderme na QSo; e tem distribuição variável e caótica nos diversos estratos epiteliais, com perda da polarização, no CEC invasor<sup>37</sup>. A expressão heterogênea ao longo do tumor refletiria fatores como as diferentes linhagens celulares que o compõe, e o gradiente nutricional a depender da localização mais centralizada ou periférica<sup>30</sup>. Postulou-se que a quantificação do Ki-67 deveria ser realizada nas áreas em que há rica proliferação, com o intuito de assinalar mecanismos funcionais<sup>28</sup>. Entretanto, existe uma grande variabilidade nos métodos para interpretação dos níveis de Ki-67 entre os diversos laboratórios, o que dificulta a reprodutibilidade e comparabilidade<sup>67</sup>. No CECC, amostras randomizadas têm sido utilizadas na contagem desta proteína em alguns estudos<sup>33,35,40</sup>, incluindo a pesquisa atual.

Permanece controversa a relação da taxa de positividade para o Ki-67 com o grau de malignidade da lesão<sup>68</sup>. O índice proliferativo foi significativamente maior no CEC invasor em comparação à QSo<sup>36</sup> e à pele normal<sup>35</sup>; maior na QSo em relação à pele fotoexposta e à normal<sup>34</sup>; e aumentou conforme o grau histológico da QSo<sup>33</sup>. Entretanto, outros autores demonstraram que porcentagem de células positivas para o Ki-67 foi menor no CEC em comparação à QSo<sup>69,70</sup>. Quando foi obtida a razão entre os índices de marcação para o Ki-67 no fronte tumoral e na respectiva pele fotoexposta, não houve diferença significativa entre QSo e CEC invasor<sup>71</sup>. No atual estudo, tampouco houve diferença estatística significativa entre os IMKi-67 nos diversos estádios do CECC. Tais fatos sugerem que a proliferação celular não é um fator independente a ser avaliado na progressão tumoral. Além disso, deve-se considerar que o tempo de replicação não é diretamente quantificado na análise IH do Ki-67 e certamente influencia no comportamento maligno<sup>30</sup>.

A imunomarcação da p53 é mais evidente na porção periférica imatura do CECC, com perda variável conforme a diferenciação<sup>26,35,39,66,72</sup>. Nos carcinomas bem a moderadamente diferenciados, os núcleos imunopositivos para p53 e Ki-67 distribuem-se de forma semelhante à periferia da lesão<sup>35,66</sup>, ou de maneira quase coincidente<sup>40</sup>. Concluiu-se que expressão da p53 indicaria a capacidade proliferativa celular, e não um potencial maligno propriamente<sup>39</sup>. Curiosamente, a expressão IH da p53 é perdida quando a célula sofre diferenciação, mesmo conservando a mutação do TP53<sup>26</sup>. Consistente com este conjunto de dados, encontra-se o achado

de Freije et al.<sup>23</sup>. As células epiteliais com defeito da função da p53 sofreriam diferenciação e descamação, via desvio da mitose, como mecanismo protetor. Segundo os autores, para o surgimento de clones malignos e, conseqüentemente, do CECC, tal desvio da mitose estaria inativado e as células com alteração da p53 permaneceriam no compartimento proliferativo.

A correlação da imunorreatividade para p53 e Ki-67, observada na QSo<sup>33</sup>, no CEC invasor<sup>35,40</sup>, e em ambos<sup>36</sup>, torna-se particularmente interessante. Por um lado, a correlação marcaria a proximidade biológica de ambas as proteínas ao revelarem o *status* em proliferação/não diferenciação da célula. Por outro, a análise da correlação poderia discriminar o papel que desempenham separadamente de acordo com as respectivas propriedades funcionais. Na pesquisa atual, houve correlação significativa entre taxa de positividade IH da p53 com a do Ki-67 na fase francamente invasora (coeficiente de determinação = 0,289), ou seja, 29% do IMKi-67 variou conforme o IMp53. Em teoria, o acúmulo de p53 não funcional, em células com potencial proliferativo, teria deflagrado a expansão tumoral somente no estágio invasor do CECC. Nesta fase, o crescimento tumoral resultaria da perda crucial do controle proliferativo, precedido pela instalação do aporte vascular/endotelial ativado, fatores estes pontualmente influenciados pela p53.

## CONCLUSÃO GERAL

- 1) Não houve diferença significativa na área vascular, evidenciada pelo CD34, entre os grupos. A área microvascular, revelada pelo CD105, aumentou, significativamente, com a progressão do carcinoma espinocelular cutâneo.
- 2) A queratose solar, o carcinoma espinocelular superficialmente invasor e o carcinoma espinocelular invasor apresentaram aumento significativo da área microvascular sob o uso de ambos os marcadores (CD34 e CD105) em comparação à respectiva pele adjacente.
- 3) Não houve diferença significativa na porcentagem de células imunomarcadas para p53 e Ki-67 entre os grupos.
- 4) Houve correlação positiva e significativa entre a área microvascular marcada pelo CD105 e o índice de marcação para a p53 no carcinoma espinocelular superficialmente invasor; 5) assim como entre o índice de marcação para p53 e para o Ki-67 no carcinoma espinocelular invasor.

Portanto, a conversão angiogênica é um evento precoce no CECC e a proliferação vascular acompanha a progressão da neoplasia. A perda da ação oncoprotetora da p53 é escalonada no CECC - associa-se à neovascularização no estágio inicial da invasão e à expansão tumoral no estágio francamente invasor -, logo atuaria diretamente na carcinogênese cutânea. O uso do marcador CD105 mostrou-se útil na avaliação da atividade angiogênica relacionada à progressão do CECC.

**REFERÊNCIAS**

1. Nery R. Cancer: An enigma in biology and society. Springer Science & Business Media; 2012.
2. Ackerman A, Mones J. Solar (actinic) keratosis is squamous cell carcinoma. *Br J Dermatol*. 2006;155(1):9-22.
3. Berhane T, Halliday G, Cooke B, Barnetson RSC. Inflammation is associated with progression of actinic keratoses to squamous cell carcinomas in humans. *Br J Dermatol*. 2002;146(5):810-15.
4. Fonseca A, de Souza EM. Tumores epiteliais malignos . In: Fonseca A, de Souza EM, eds. *Dermatologia clínica*. 1ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan SA; 1984:481.
5. Kessler GM, Ackerman AB. Nomenclature for very superficial squamous cell carcinoma of the skin and of the cervix: A critique in historical perspective. *Am J Dermatopathol*. 2006;28(6):537-45.
6. Karia PS, Han J, Schmults CD. Cutaneous squamous cell carcinoma: Estimated incidence of disease, nodal metastasis, and deaths from disease in the united states, 2012. *J Am Acad Dermatol*. 2013;68(6):957-66.
7. Estimativa I. Incidência do câncer no brasil/instituto nacional de câncer José Alencar Gomes da Silva, coordenação de prevenção e vigilância. 2014. Rio de Janeiro. Disponível <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/>. Acesso em. 2014;20.
8. Alam M, Ratner D. Cutaneous squamous-cell carcinoma. *N Engl J Med*. 2001;344(13):975-83.
9. Jensen AØ, Lamberg AL, Olesen AB. Epidemiology of non-melanoma skin cancer. In: *Non-surgical treatment of keratinocyte skin cancer*. Springer; 2009:15-24.

10. Brantsch KD, Meisner C, Schönfisch B, et al. Analysis of risk factors determining prognosis of cutaneous squamous-cell carcinoma: A prospective study. *The lancet oncology*. 2008;9(8):713-20.
11. Lansbury LE. An evidence based approach towards optimising the management of patients with squamous cell carcinoma of the skin. 2014.
12. Liu G, Robins HI. A História Natural e a Biologia do Câncer, in: Pollock RE (Ed), UICC manual de oncologia clínica, oitava ed. Fundação Oncocentro de São Paulo, São Paulo, 2006. pp.1-18.
13. Elmetts CA, Athar M. Milestones in photocarcinogenesis. *Nature Milestones*. 2013:E13-E17.
14. Brash D. Roles of the transcription factor p53 in keratinocyte carcinomas. *Br J Dermatol*. 2006;154(s1):8-10.
15. Capitanio JS. Instabilidade genômica em carcinoma basocelular humano revelada através da análise de seqüências repetitivas. 2008.
16. Kim KH, Park EJ, Seo YJ, et al. Immunohistochemical study of cyclooxygenase-2 and p53 expression in skin tumors. *J Dermatol*. 2006;33(5):319-25.
17. Arruda JT, Bordin BM, Miranda LCB, Maia DLM, de Oliveira Moura, Katia Karina Verolli. Proteína P53 e o câncer: Controvérsias e esperanças. *Estudos*. 2008;35(1):123-41.
18. Ziegler A, Jonason AS, Leffell DJ, et al. Sunburn and p53 in the onset of skin cancer. *Nature*. 1994;372(6508):773-6.
19. Jonason AS, Kunala S, Price GJ, et al. Frequent clones of p53-mutated keratinocytes in normal human skin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(24):14025-9.
20. Ren ZP, Hedrum A, Ponten F, et al. Human epidermal cancer and accompanying precursors have identical p53 mutations different from p53 mutations in adjacent areas of clonally expanded non-neoplastic keratinocytes. *Oncogene*. 1996;12(4):765-73.

21. Poten F, Lundeberg J, Asplund A. Principles of Tumor Biology and Pathogenesis of BCCs and SCCs, in: Bologna JL, Jorizzo JL, Rapini RP, Callen JP, Horn TD, Mancini AJ, et al. (Eds), *Dermatology*, second ed., Elsevier, Mosby, 2008.pp.1627-39.
22. Ahmadian A, Ren ZP, Williams C, Ponten F, Odeberg J, Ponten J, et al (1998). Genetic instability in the 9q22. 3 region is a late event in the development of squamous cell carcinoma. *Oncogene*, 17(14),1837-43.
23. Freije A, Molinuevo R, Ceballos L, et al. Inactivation of p53 in human keratinocytes leads to squamous differentiation and shedding via replication stress and mitotic slippage. *Cell reports*. 2014;9(4):1349-60.
24. Strano S, Dell'Orso S, Di Agostino S, Fontemaggi G, Sacchi A, Blandino G. Mutant p53: An oncogenic transcription factor. *Oncogene*. 2007;26(15):2212-9.
25. Freed-Pastor WA, Prives C. Mutant p53: One name, many proteins. *Genes Dev*. 2012;26(12):1268-86.
26. Ren Z, Pontén F, Nistér M, Pontén I. Two distinct p53 immunohistochemical patterns in human squamous-cell skin cancer, precursors and normal epidermis. *International journal of cancer*. 1996;69(3):174-9.
27. Barzilai A, Lyakhovitsky A, Trau H, Fogel M, Huszar M. Expression of p53 in the evolution of squamous cell carcinoma: Correlation with the histology of the lesion. *J Am Acad Dermatol*. 2007;57(4):669-76.
28. van Diest PJ, Brugal G, Baak JP. Proliferation markers in tumours: Interpretation and clinical value. *J Clin Pathol*. 1998;51(10):716-24.
29. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100(1):57-70.
30. Arisawa EAL, Moraes E, da Rocha RF, de Almeida JD. Marcadores biológicos: PCNA e ki-67 breve revisão. *Brazilian Dental Science*. 2010;2(1).
31. Cattoretti G, Becker MH, Key G, et al. Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB 1 and MIB 3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections. *J Pathol*. 1992;168(4):357-63.

32. Jonat W, Arnold N. Is the ki-67 labelling index ready for clinical use? *Ann Oncol.* 2011;22(3):500-2.
33. Shimizu T, Oga A, Murakami T, Muto M. Overexpression of p53 protein associated with proliferative activity and histological degree of malignancy in solar keratosis. *Dermatology.* 1999;199(2):113-8.
34. 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(12):1996-2002.
35. Batinac T, Zamolo G, Jonjic N, Gruber F, Petroveckii M. p53 protein expression and cell proliferation in non-neoplastic and neoplastic proliferative skin disease. *Tumori.* 2004;90(1):120-7.
36. Verdolini R, Amerio P, Goteri G, et al. Cutaneous carcinomas and preinvasive neoplastic lesions. role of MMP-2 and MMP-9 metalloproteinases in neoplastic invasion and their relationship with proliferative activity and p53 expression. *J Cutan Pathol.* 2001;28(3):120-6.
37. Bordbar A, Dias D, Cabral A, Beck S, Boon ME. Assessment of cell proliferation in benign, premalignant and malignant skin lesions. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2007;15(2):229-35.
38. Oh CW, Penneys N. P27 and mib1 expression in actinic keratosis, bowen disease, and squamous cell carcinoma. *Am J Dermatopathol.* 2004;26(1):22-6.
39. Lee Y, Teh M. p53 expression in pseudoepitheliomatous hyperplasia, keratoacanthoma, and squamous cell carcinoma of skin. *Cancer.* 1994;73(9):2317-23.
40. Shimizu T, Muto M, Murakami T, Furumoto H, Mogami S, Asagami C. Overexpression of p53 protein associated with proliferative activity as evaluated by ki-67 immunostaining in well-differentiated squamous cell carcinoma of the skin. *Dermatology.* 1997;195(3):224-7.

41. Velasco P, Lange-Asschenfeldt B. Dermatological aspects of angiogenesis. *Br J Dermatol.* 2002;147(5):841-52.
42. Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *CancerSpectrum Knowledge Environment.* 1990;82(1):4-6.
43. Lingen MW. Angiogenesis in the development of head and neck cancer and its inhibition by chemopreventive agents. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1999;10(2):153-64.
44. Smith-McCune K, Zhu YH, Hanahan D, Arbeit J. Cross-species comparison of angiogenesis during the premalignant stages of squamous carcinogenesis in the human cervix and K14-HPV16 transgenic mice. *Cancer Res.* 1997;57(7):1294-300.
45. Bolontrade MF, Stern MC, Binder RL, Zenklusen JC, Gimenez-Conti IB, Conti CJ. Angiogenesis is an early event in the development of chemically induced skin tumors. *Carcinogenesis.* 1998;19(12):2107-13.
46. Nijsten T, Colpaert C, Vermeulen P, Harris A, 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(4):837-45.
47. Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nature reviews cancer.* 2003;3(6):401-10.
48. Rak J, Joanne LY, Klement G, Kerbel RS. Oncogenes and angiogenesis: Signaling three-dimensional tumor growth. 2000;5(1):24-33.
49. Teodoro JG, Evans SK, Green MR. Inhibition of tumor angiogenesis by p53: A new role for the guardian of the genome. *Journal of molecular medicine.* 2007;85(11):1175-86.
50. Strieth S, Hartschuh W, Pilz L, Fusenig NE. Angiogenic switch occurs late in squamous cell carcinomas of human skin. *Br J Cancer* 2000; 82: 591-600.
51. Van Kempen LC, Rhee J, Dehne K, Lee J, Edwards DR, Coussens LM. Epithelial carcinogenesis: Dynamic interplay between neoplastic cells and their microenvironment. *Differentiation.* 2002;70(9-10):610-23.

52. Rak J, Filmus J, Kerbel R. Reciprocal paracrine interactions between tumour cells and endothelial cells: The 'angiogenesis progression'hypothesis. *Eur J Cancer*. 1996;32(14):2438-50.
53. Sharma S, Sharma M, Sarkar C. Morphology of angiogenesis in human cancer: A conceptual overview, histoprognostic perspective and significance of neoangiogenesis. *Histopathology*. 2005;46(5):481-9.
54. Vermeulen P, Gasparini G, Fox S, et al. Second international consensus on the methodology and criteria of evaluation of angiogenesis quantification in solid human tumours. *Eur J Cancer*. 2002;38(12):1564-79.
55. Friedman HI, Cooper PH, Wanebo HJ. Prognostic and therapeutic use of microstaging of cutaneous squamous cell carcinoma of the trunk and extremities. *Cancer*. 1985;56(5):1099-105.
56. Johnson RE, Ackerman LV. Epidermoid carcinoma of the hand. *Cancer*. 1950;3(4):657-66.
57. Einspahr JG, Alberts DS, Wameke JA, et al. Relationship of p53 mutations to epidermal cell proliferation and apoptosis in human UV-induced skin carcinogenesis. *Neoplasia*. 1999;1(5):468-75.
58. Taguchi M, Watanabe S, Yashima K, Murakami Y, Sekiya T, Ikeda S. Aberrations of the tumor suppressor p53 gene and p53 protein in solar keratosis in human skin. *J Invest Dermatol*. 1994;103(4):500-3.
59. Kubo Y, Urano Y, Yoshimoto K, et al. p53 gene mutations in human skin cancers and precancerous lesions: Comparison with immunohistochemical analysis. *J Invest Dermatol*. 1994;102(4):440-4.
60. Raica M, Cimpean AM, & Ribatti D. (2009). Angiogenesis in pre-malignant conditions. *European journal of cancer*, 45(11),1924-34.
61. Eichten A, Hyun WC, Coussens LM. Distinctive features of angiogenesis and lymphangiogenesis determine their functionality during de novo tumor development. *Cancer Res*. 2007;67(11):5211-20.

62. Skobe M, Rockwell P, Goldstein N, Vosseler S, Fusenig NE. Halting angiogenesis suppresses carcinoma cell invasion. *Nat Med.* 1997;3(11):1222-7.
63. Eberhard A, Kahlert S, Goede V, Hemmerlein B, Plate KH, & Augustin HG. (2000). Heterogeneity of angiogenesis and blood vessel maturation in human tumors: implications for antiangiogenic tumor therapies. *Cancer research*, 60(5),1388-93.
64. Hlatky L, Hahnfeldt P, & Folkman J. (2002). Clinical application of antiangiogenic therapy: microvessel density, what it does and doesn't tell us. *Journal of the National Cancer Institute*, 94(12), 883-93.
65. Pastushenko I, Gracia-Cazana T, Vicente-Arregui S, et al. Squamous cell carcinomas of the skin explore angiogenesis-independent mechanisms of tumour vascularization. *J Skin Cancer.* 2014;2014:651501.
66. Mansoor A, McKee PH, Simpson JA, McGuire B, Hobbs C. Prognostic significance of ki-67 and p53 immunoreactivity in cutaneous squamous cell carcinomas. *Am J Dermatopathol.* 1996;18(4):351-7.
67. Polley MY, Leung SC, McShane LM, et al. An international Ki-67 reproducibility study. *J Natl Cancer Inst.* 2013;105(24):1897-906.
68. Cernea CR, Ferraz AR, De Castro IV, et al. Ki-67 index and skin carcinomas with skull base invasion: A case-control study. *Cancer Therapy.* 2005;3:471-6.
69. Talghini S, Halimi M, Baybordi H. Expression of P27, Ki-67 and P53 in squamous cell carcinoma, actinic keratosis and bowen disease. *Pak J Biol Sci.* 2009;12(12):929-33.
70. Tilli C, Ramaekers F, Broers J, Hutchison C, Neumann H. Lamin expression in normal human skin, actinic keratosis, squamous cell carcinoma and basal cell carcinoma. *Br J Dermatol.* 2003;148(1):102-9.
71. Onodera H, Nakamura S, Sugai T. Cell proliferation and p53 protein expression in cutaneous epithelial neoplasms. *Am J Dermatopathol.* 1996;18(6):580-8.
72. Oram Y, Orengo I, Baer SC, Ocal T. p53 protein expression in squamous cell carcinomas from sun-exposed and non-sun-exposed sites. *J Am Acad Dermatol.* 1994;31(3):417-22.

## Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

[www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html](http://www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html)

CEP, 14/12/07.  
(Grupo III)

2ª VIA

**PARECER PROJETO:** Nº 070/2007 (Este nº deve ser citado nas correspondências referente a este projeto).  
**CAAE:** 0044.0.146.000-07.

### I-IDENTIFICAÇÃO:

**PROJETO: “O PAPEL DA NEOANGIOGÊNESE NA PROGRESSÃO DA CERATOSE SOLAR PARA O CARCINOMA ESPINOCELULAR”**

**PESQUISADOR RESPONSÁVEL:** Maria Leticia Cintra

**INSTITUIÇÃO:** Hospital das Clínicas/UNICAMP

**APRESENTAÇÃO AO CEP:** 08/02/2007

**APRESENTAR RELATÓRIO EM:** 27/02/08 (O formulário encontra-se no site acima)

### II - OBJETIVOS

Estudar o papel da neoangiogênese na progressão da ceratose solar ao carcinoma espinocelular superficial e desse para o carcinoma espinocelular invasor.

### III - SUMÁRIO

Serão estudadas amostras de biópsia de pele previamente colhidas e arquivadas no Laboratório de Anatomia Patológica do HC/Unicamp, colhidas entre os anos de 2001 a 2006, de 63 indivíduos, sendo 23 com CS hipertrófica, 20 com CEC incipiente e 20 com CEC invasor. Serão incluídos indivíduos brancos, sadios e com a pele cronicamente exposta ao sol. As amostras serão tratadas com técnica imunoistoquímica para VEGF, CD34 e CD105, preparadas por um mesmo técnico, sendo a seguir examinadas de forma aleatória e cega, ou seja, desconhecendo-se dados clínicos, de evolução ou de diagnóstico histopatológico prévio. Posteriormente será feita correlação com dados obtidos a partir do prontuário clínico arquivado na SAM. O cronograma prevê 12 meses para a realização do estudo.

### IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

Trabalho a ser realizado por aluna do 5º ano do curso de medicina, sob supervisão da pesquisadora responsável. Ambas possuem currículo na plataforma lattes. As pesquisadoras solicitam dispensa do TCLE por se tratar de estudo retrospectivo, tendo se comprometido a comunicar ao paciente ou à comissão de ética do HC qualquer dado que possa representar algum risco à saúde dos sujeitos. Foi apresentada folha de orçamento no modelo do CEP informando gastos de R\$ 28.650,00 e financiamento via FAPESP do material de consumo. A documentação encontra-se adequada.



## V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa supracitada.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

## VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

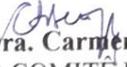
O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

## VII - DATA DA REUNIÃO

Homologado na II Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 27 de fevereiro de 2007.

  
**Prof. Dra. Carmên Silvia Bertuzzo**  
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA  
FCM / UNICAMP

**ANEXO 2****Artigo 1**

<b>Assunto:</b>	RES: RES: Permission to include published article in thesis
<b>De:</b>	Kavita Patel (kavita.patel@hc.fm.usp.br)
<b>Para:</b>	etienneflorence@yahoo.com.br;
<b>Cc:</b>	clinics@hc.fm.usp.br;
<b>Data:</b>	Quarta-feira, 3 de Fevereiro de 2016 9:41

**PERMISSION GRANT**

We hereby grant permission for the use of the following article in the Ph.D. thesis of Michelle Florence, Universidade Estadual de Campinas.

- Florence MEB, Massuda JY, Bröcker EB, Metze K, Cintra ML, & Souza EMD. (2011). Angiogenesis in the progression of cutaneous squamous cell carcinoma: an immunohistochemical study of endothelial markers. *Clinics*, 66(3), 465-468.

*“This thesis is for academic use only and it is not going to be used for commercial, advertising or promotion purposes. I am planning to make one printed copy of my thesis, which will be displayed at The University (Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, Campinas, SP, Brazil) library. In addition, an eletronic version of the thesis will be made available at the University Thesis Database”.* Michelle Florence

Yours Sincerely,

Edmund Chada Baracat  
 Editor, CLINICS  
 Kavita Kirankumar Patel-Rolim  
 Editorial Director, CLINICS  
 www.clinics.org.br

Editorial Office Address  
 Rua Dr. Ovídio Pires de Campos 225, 6º andar  
 05403-010 - São Paulo/SP - Brasil  
 Tel.: 55 11 2661-6235  
 Fax: 55 11 2661-7524

**ANEXO 3****Artigo 2**

**De:** Permissions Helpdesk <permissionshelpdesk@elsevier.com>

**Data:** 2 de outubro de 2015 14:45:21 BRT

**Para:** "etienneflorence@yahoo.com.br" <etienneflorence@yahoo.com.br>

**Assunto: RE: accepted manuscript**

Dear Michelle,

Thank you for your e-mail.

As an Elsevier journal author, you retain various rights including Inclusion of the article in a thesis or dissertation (provided that this is not to be published commercially) whether in part or *in toto*; see <http://www.elsevier.com/about/company-information/policies/copyright#Author%20rights> for more information. As this is a retained right, no written permission is necessary provided that proper acknowledgement is given.

This extends to the online version of your dissertation and would include any version of the article including the final published version provided that it is not available as an individual download but only embedded within the dissertation itself.

If the article would be available as an individual download, only the preprint or (subject to the journal-specific embargo date) accepted manuscript version, but not the final published version, may be made available; see <http://www.elsevier.com/journal-authors/sharing-your-article> for more information. Information regarding embargo dates can be found here [http://www.elsevier.com/data/assets/pdf\\_file/0018/121293/external-embargo-list.pdf](http://www.elsevier.com/data/assets/pdf_file/0018/121293/external-embargo-list.pdf)

If you need any additional assistance, please let us know.

Best Wishes,

Laura

**Laura Stingelin**

**Permissions Helpdesk Associate**

Elsevier

1600 John F. Kennedy Boulevard

Suite 1800

Philadelphia, PA 19103-2899

T: (215) 239-3867

F: (215) 239-3805

E: [l.stingelin@elsevier.com](mailto:l.stingelin@elsevier.com)

*Questions about obtaining permission: whom to contact? What rights to request?*

*When is permission required? Contact the Permissions Helpdesk at:*

+1-800-523-4069 x 3808

[permissionshelpdesk@elsevier.com](mailto:permissionshelpdesk@elsevier.com)

## ANEXO 4

	UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS COMISSÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO	
<b>DECLARAÇÃO</b>		
<p>As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada "ETAPAS DA PROGRESSÃO DO CARCINOMA ESPINOCELULAR CUTÂNEO – estudo imunohistoquímico das proteínas p53 e Ki-67 e de marcadores endoteliais", não infringem os dispositivos da Lei nº9. 610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.</p>		
<p>Campinas, 10/02/2016</p>		
<p></p>		
<p>Autor(a) Michelle Etienne Baptistella Florence</p>		
<p>RG nº 11381081</p>		
<p></p>		
<p>Orientador(a) Etemir Macedo de Souza</p>		
<p>RG nº 3158652</p>		
<p>Faculdade de Ciências Médicas / UNICAMP – Caixa Postal: 6.111        Maxwellia Vieira de Camargo, 126 – Campinas/SP – CEP: 13.083-970        Fone: (19) 3521-3361 – E-MAIL: cpg@fcm.unicamp.br</p>		