



Universidade Federal de Juiz de Fora

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

NÚCLEO DE PESQUISA EM IMUNOLOGIA

Marília de Pádua Dornelas Corrêa

**EXPRESSÃO DE MARCADORES DE PROLIFERAÇÃO E APOPTOSE
EM DIFERENTES FORMAS DE CARCINOMA BASOCELULAR
HUMANO**

Juiz de Fora

2007

Marília de Pádua Dornelas Corrêa

**EXPRESSÃO DE MARCADORES DE PROLIFERAÇÃO E APOPTOSE
EM DIFERENTES FORMAS DE CARCINOMA BASOCELULAR
HUMANO**

Dissertação apresentada para obtenção de título de Mestre pelo
Curso de Pós-Graduação em Saúde Brasileira da Universidade
Federal de Juiz de Fora

Orientadora: Prof^ª Dr^ª. Ana Paula Ferreira

Co-orientadora: Prof^ª Dr^ª. Ângela Maria Gollner

Juiz de Fora

2007

Marília de Pádua Dornelas Corrêa

EXPRESSÃO DE MARCADORES DE PROLIFERAÇÃO E APOPTOSE EM DIFERENTES FORMAS DE CARCINOMA BASOCELULAR HUMANO

Dissertação apresentada para obtenção de título de Mestre pelo Curso de Pós-Graduação em Saúde Brasileira da Universidade Federal de Juiz de Fora.

Juiz de Fora, 2007

Profª Drª Ana Paula Ferreira

Profª Drª Ana Paula Ferreira, Doutora em Imunologia pela USP
Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia da Universidade Federal de Juiz
de Fora.

Profª Drª Maria Aparecida de Souza

Profª Drª Maria Aparecida de Souza, Doutora em Imunologia pela USP
Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia da Universidade Federal de Juiz
de Fora.

Profª Drª Sônia Maria Neumann Cupolilo

Profª Drª Sônia Maria Neumann Cupolilo, Doutora em Biologia Parasitária, Fundação
Oswaldo Cruz, FIOCRUZ.
Departamento de Anatomia Patológica da Universidade Federal de Juiz de Fora

Aos meus pais pelo encorajamento durante toda a minha vida.

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

Às minhas filhas queridas, que muitas vezes tiveram que suportar minha ausência, falta de carinho e atenção.

Ao meu irmão pelo incentivo e presença constante nestes momentos.

A todos que se esforçaram para melhorar um pouco a cada dia, mesmo que muitas vezes falhando sob o peso das próprias imperfeições.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo Dom da Vida e por ter me permitido a inteligência, iluminando meu caminho por todos estes anos.

Às doutoras Ana Paula Ferreira, Ângela Maria Gollner pela escolha do tema, orientação, paciência, competência e dedicação na execução do trabalho.

À Michele Rodrigues pela disponibilidade, atenção, carinho, compreensão, amizade e profissionalismo, sem os quais este trabalho não teria sido concluído.

À Dra. Maria Aparecida de Souza pelo seu incentivo constante.

Aos técnicos e funcionários do CITO Laboratório pela atenção, disponibilidade e apoio permanente.

Agradeço a todos que, de uma forma ou de outra, possibilitaram a conclusão deste trabalho, a eles, minha sincera gratidão.

“De tudo ficam três coisas:

A certeza de que estamos sempre começando...

A certeza de que precisamos continuar...

A certeza de que seremos interrompidos antes de terminar...

Portanto, devemos:

Fazer da interrupção um caminho novo...

Da queda, um passo de dança...

Do medo, uma escada...

Do sonho, uma ponte...

Da procura, um encontro...”

Fernando Pessoa

RESUMO

O Carcinoma basocelular (CBC) é o câncer mais comum em humanos, tendo predileção pela cabeça e pescoço, e sua incidência vem aumentando nos últimos anos. Estudos utilizando recursos da biologia molecular e genética, associados à histomorfologia, permitem a identificação de fatores de risco no desenvolvimento de lesões mais recorrentes e agressivas e propõem métodos mais eficazes de prevenção. O objetivo foi correlacionar a expressão dos marcadores de apoptose (p53 e Bcl-2) e proliferação celular (Ki-67 e PCNA) com os indicadores histológicos de gravidade do tumor. Foram estudadas cinco amostras de cada uma das formas nodular, morfeiforme e superficial e um grupo controle com três pacientes livres de lesão. O teste de Mann Whitney foi utilizado na comparação da expressão destes marcadores com a forma de apresentação do CBC. A marcação do Bcl-2 foi expressiva nos CBCs ditos agressivos. A variante morfeiforme foi a que mais o expressou, seguida pela nodular. Dos tumores estudados, 66,7% (dez) expressaram fortemente o p-53 e, nos controles, um indivíduo o expressou fracamente na camada basal. Nossos resultados mostram maior expressão do Ki-67 no CBC nodular e superficial, sem expressão nos controles. O PCNA mostrou forte marcação em todos os tipos de tumores e nos controles. O Bcl-2 e a p-53 apresentam tendência para diagnosticar gravidade do Carcinoma Basocelular, e o Ki-67, por seu comportamento variável, não pode ser considerado como marcador de gravidade, assim como o PCNA que não foi um bom marcador de proliferação celular.

Palavras-Chave: Carcinoma Basocelular, Neoplasias Cutâneas, Imunoistoquímica, Marcadores biológicos de tumor, Proteínas de Ciclo Celular, Apoptose.

ABSTRACT

Basal Cell Carcinoma (BCC) is the most common form of human cancer, showing a predilection for the head and neck region. Its incidence has been increasing over the last years. Studies employing resources from molecular and genetic medicine associated with histomorphology allow the identification of risk factors in the development of more recurring and aggressive lesions, and propose more efficient prevention methods. The objective was to correlate the expression of markers of apoptosis (p53 and bcl-2) and cell proliferation (Ki-67 and PCNA) with histological indicators of the gravity of the tumor. In this study we analyzed five samples of the nodular, sclerosing and superficial forms, respectively, and one control group with three lesion-free patients. The Mann-Whitney test was used to compare the expression of these markers with the form of manifestation of BCC. Bcl-2 expression was significant in the BCCs said to be aggressive. The sclerosing variant expressed it the most, followed by the nodular variant. Of the studied growths, 66.7% (10) expressed p-53 strongly. Among the controls, one individual expressed it weakly in the basal layer. Our results show a larger expression of Ki-67 in nodular and superficial BCCs, with no expression whatsoever in the controls. PCNA was strongly expressed in all types of tumors and in the controls. Bcl-2 and p-53 have a tendency to indicate the gravity of Basal Cell Carcinoma. In contrast, Ki-67, due to its variable behaviour, can not be considered to be a marker of gravity. Furthermore, OCNA was not a good marker of cell proliferation.

Keywords: Basal cell carcinoma, Skin neoplasms, Immunohistochemistry, Tumor Markers/ biological, Cell cycle proteins, Apoptosis.

LISTA DE ABREVIATURAS

Apaf-1 – Fator 1 Ativador da Apoptose

Bax – Gene de Proteína X Associada ao Bcl-2

Bcl-2 – Gene

Bcl-2 – Proteína Inibidora da Apoptose

Bid – Gene de Domínio de Interação B43 da família Bcl-2

CBC – Carcinoma Basocelular

CDK – Proteína Quinase Ciclina Dependente

CEC – Carcinoma Espinocelular

DAB – Diaminobenzidina

DNA – Ácido Desoxiribonucleico

EGF – Fator de Crescimento Epidérmico

FAAD – “Faz-Associated Death Domain”

Família Faz (CD95) – Sinalizador de Morte Celular

FasL – Fasligante

G0 – Fase de quiescência do Ciclo Celular

G1 – Fase Ciclo Celular (pré-síntese DNA)

G2 – Fase Ciclo Celular (pós-replicação DNA)

HE – Hematoxilina-eosina

IFN α - Interferon alfa

IHQ – Imunoistoquímica

INCA – Instituto Nacional do Câncer

Ki-67 – Antígeno que corresponde à proteína não histona nuclear expressada pelas células nas fases proliferativas G1, G2, M e S

μ – Micra

MPF – Fator Promotor de Maturação

p53 – Gene Supressor de Tumor

p53 – Proteína p53

p/c – por campo

PCNA – Antígeno Nuclear de Células Proliferativas

PDGF – Fator de Crescimento Derivado de Plaqueta

pRb – Gene Retinoblastoma

S ou M – Fase Ciclo Celular (síntese DNA)

Ser-70 – “Locus” Cromossomial

TGF- α – Fator α (Alfa) de Crescimento de Tumor

TNFR1 – Receptor Tipo I do Fator Necrosante de Tumor

UVB – Raios Ultravioleta B

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO	13
2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1- Carcinoma Basocelular	15
2.1.1- Aspectos Gerais	15
2.1.2- Formas Clínicas	16
2.1.3- Características Histológicas	18
2.1.4- Fisiopatologia	19
2.1.5- Tratamento	20
2.2- Ciclo Celular – Mecanismos Reguladores e Proliferação Celular	22
2.3- Oncogênese	24
2.4- Apoptose	25
2.5- Marcadores Tumorais	26
2.5.1- p53	26
2.5.2- PCNA	28
2.5.3- Ki-67	29
2.5.4- Bcl-2	31
3 – OBJETIVOS	32
4 – METODOLOGIA	33
4.1- Pacientes e Controles	33
4.2- Coleta do Material	33
4.3- Análise Histológica	33
4.4- Avaliação Imunoistoquímica	34
4.5- Tratamento Estatístico	35
5 – RESULTADOS	36
5.1- Avaliação do Perfil Histopatológico	36
5.2- Avaliação dos Marcadores p-53, PCNA, Ki-67 e B-cl2por Imunoistoquímica	37
5.2.1- p53	38

5.2.2- PCNA	40
5.2.3- Ki-67	42
5.2.4- Bcl-2	44
5.3- Resultado Estatístico	46
6 – DISCUSSÃO	47
7 – CONCLUSÕES	50
8– PERSPECTIVAS FUTURAS.....	51
ANEXO I	52
REFERÊNCIAS	53

1- INTRODUÇÃO

O Carcinoma basocelular (CBC) é o tipo de câncer mais comum em humanos, ocorre mais freqüentemente em pacientes acima de 50 anos, com pele tipo I (FREEDBERG, 2003), tem predileção pelas áreas de cabeça e pescoço, e sua incidência vem aumentando nos últimos anos (INCA, 2005; LAGE *et al*, 2001).

Muitas formas de CBC apresentam crescimento lento, baixa agressividade e são efetivamente retiradas pelas diversas formas de tratamento disponíveis (DIXON; LEE; MCGREGOR, 1989). Contudo uma minoria de CBCs tem comportamento biológico agressivo, causando extensa destruição tissular ou, mais raramente, dão metástases (CROWSON, 2006; JACOBS, 1982).

O CBC pode cursar com múltiplas recorrências e, segundo Koplin e Zaren (1980), este fato é detectado numa taxa de 0,5% a 14% nos casos de tumores primários não tratados e, para Levine e Bailin (1980), estima-se que de 10.000 a 15.000 indivíduos procuram assistência médica com recorrência de CBC, previamente tratado.

Com o objetivo de erradicar o CBC, os portadores freqüentemente precisam se submeter a vários procedimentos cirúrgicos, com potencial de deformidades funcionais e cosméticas, morbidade e até mais raramente mortalidade, gerando uma elevação significativa das despesas com assistência médica e hospitalar (DIXON; LEE; MCGREGOR, 1989; ISHI *et al*, 2004).

Acompanhando o crescente número de casos novos do CBC e em função do conseqüente aumento de casos recorrentes, estudos têm sido feitos no sentido de determinar os parâmetros com significado prognóstico na predição daqueles que terão comportamento mais agressivo, que poderão recorrer e dar metástases (CROWSON, 2006; JACOBS *et al*, 1982; KOPLIN e ZAREN, 1980; LEVINE e BAILIN, 1980; NASSER, 2005).

No estudo de Dixon *et al* (1989), o parâmetro clínico “localização” foi o único relevante, quando compararam casos de localização em cabeça e pescoço com tronco e extremidade. Particularmente problemática é a área que inclui a zona H central da face e certas lesões do couro cabeludo. Acredita-se que a causa para alta recorrência neste grupo seja multifatorial e inclua tendência do tumor a se espalhar ao longo da fusão de planos embrionários, planos faciais, periósteo e pericôndrio, bem como excisão inadequada (econômica) por razões cosméticas (SWANSON; GREKIN; BAKER, 1983).

Entre os parâmetros histológicos relacionados à recorrência e ao comportamento inicial mais agressivo do CBC, são descritos: ausência de paliçada periférica nos blocos tumorais; pleomorfismo nuclear; forma dos blocos tumorais; padrão de crescimento (expansivo ou infiltrativo) e, finalmente, distância da margem de ressecção (CROWSON, 2006; QUEIROZ, 1997; TILLI *et al.*, 2005). Desta forma o CBC que apresenta estes parâmetros preditivos teria alta probabilidade de recorrer e de ter um comportamento biológico mais agressivo.

Estudos da histogênese do CBC, utilizando recursos da biologia molecular e genética, associados às avaliações histomorfológicas, inquéritos epidemiológicos, têm permitido a identificação de fatores de risco para o desenvolvimento de lesões com maior potencial de recorrência e mais agressivas, propor métodos mais eficazes de prevenção e avançar nas propostas terapêuticas com redução de custos e dano estético (KOPKE e SCHMIDT, 2002; QUEIROZ, 1997; SOUZA *et al.*, 2004).

A complementação do estudo histológico e morfológico do CBC com marcadores biológicos, utilizando a técnica de imunoistoquímica (IHQ), permite a compreensão de alterações morfofuncionais que ocorrem no processo de transformação neoplásica. Informações sobre o comportamento biológico das neoplasias podem auxiliar na definição do tipo de tratamento a ser instituído, bem como permitir o desenvolvimento de novas drogas, dirigidas especificamente a moléculas celulares facilitadoras da propagação tumoral (AGUIAR, 1996; QUEIROZ, 1997; SOUZA *et al.*, 2004).

A proliferação celular e a morte celular programada (apoptose) são consideradas como importantes eventos na carcinogênese. Sabe-se também que a luz ultravioleta causa danos no DNA dos queratinócitos, sendo que estes danos podem ser reparados ou eliminados através de apoptose, prevenindo-se assim o desenvolvimento do câncer (BORTOLUCCI e GALVÃO, 2002; KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005; PRAXEDES, 2003). Alterações no mecanismo de controle de apoptose e o aumento da proliferação celular estão associados à predisposição dos indivíduos ao câncer (CAVALCANTI JR *et al.*, 2003; HWA JEE *et al.*, 1998; MURPHY *et al.*, 2002; PRAXEDES, 2003; RUBIN; CHEN; RATNER, 2005; TILLI *et al.*, 2005).

Considerando-se o número crescente de CBC, a necessidade de resultados estéticos com procedimentos cirúrgicos cada vez menores, redução de recorrências e a identificação do potencial de agressividade, é que propomos um estudo da expressão dos marcadores p53 e Bcl-2 (apoptose) e PCNA e Ki-67 (proliferação celular), objetivando avaliar a relação da expressão destes marcadores nos padrões histológicos: nodular, morfeiforme e superficial em indivíduos submetidos a procedimento cirúrgico de rotina.

2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1- Carcinoma Basocelular

2.1.1- Aspectos Gerais

O carcinoma basocelular, também chamado de basalioma, epitelioma basocelular, úlcera de Jacob, foi evidenciado pela primeira vez através de estudos realizados em esqueletos mumificados do antigo Egito há mais de 4.000 anos. A primeira referência clara e individualizada do CBC se deve a Jacob que, em 1824, o descreveu como o câncer mais comum entre os caucasianos (BANDEIRA *et al*, 2003; CEBALLOS e ACOSTA, 2003; KOPKE e SCHMIDT, 2002; TILLI *et al*, 2005).

O CBC foi descrito como neoplasia cutânea invasiva mais comum encontrada em seres humanos, representando 71,4% dos tumores malignos de pele (CEBALLOS e ACOSTA, 2003; HABIF, 2005; McCARTHY, 1990; MÉLEGA, 2002; RUBIN; CHEN; RATNER, 2005).

A incidência do CBC é difícil de ser determinada, devido ao fato de que o câncer de pele não melanoma não ter os tipos histológicos individualizados nos registros estatísticos de câncer de pele. A tarefa fica mais complicada pela variedade de características geográficas na incidência destes tumores. Porém, a tendência clara é de estar aumentando o número de casos. A Austrália tem a mais alta taxa de CBC no mundo, com algumas regiões mostrando uma incidência superior a 2% por ano. Nos EUA, têm sido estimados mais de 407 casos de CBC/100.000 homens brancos e 212 casos/100.000 mulheres brancas (BANDEIRA *et al*, 2003; BUETTNER e RAASH, 1998; RUBIN; CHEN; RATNER, 2005; TILLI *et al*, 2005).

A alta incidência desta patologia nos indivíduos nos EUA e na Austrália se deve ao tipo de pele humana encontrada nestas regiões. Segundo a classificação de Fitzpatrick, estes indivíduos possuem tipo de pele I ou II. O tipo I tem cor leucodérmica e, quando exposta ao sol, sempre queima e nunca bronzeia e o tipo II, também leucodérmica, normalmente queima e bronzeia muito pouco (GAMONAL, 2002).

No Brasil, a incidência de casos novos de câncer de pele não melanoma, estimados para o ano de 2005, foi de 56.420 casos em homens e de 56.000 em mulheres, sendo que,

deste total, 70% seriam CBC. Estes valores correspondem a um risco estimado de 62 casos novos a cada 100.000 homens e 60 para cada 100.000 mulheres, segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA) (2005) e Habif (2005). Estes autores também afirmam que o CBC é ligeiramente mais comum em homens do que em mulheres, sendo muito raro em negros.

O CBC pode ocorrer em qualquer idade, mas a incidência aumenta significativamente após os 40 anos e a incidência em pessoas mais jovens está aumentando, possivelmente como resultado da exposição aumentada ao sol, sendo que a exposição à radiação ultravioleta é geralmente aceita como a maior causa do aparecimento do CBC. O risco desta doença está significativamente aumentado nos casos de exposição solar durante recreação na infância e adolescência, assim como nos casos de exposição contínua e intensa na vida adulta (BANDEIRA *et al*, 2003; HABIF, 2005; MACKEE; CALONJE; GRANTER, 2005; McCARTHY, 1990; MÉLEGA, 2002; TILLI *et al*, 2005).

Este tumor aparece em áreas corporais expostas ao sol, como a face e a superfície extensora dos membros superiores. Nos homens, compromete ainda tronco e orelhas e, nas mulheres, acomete as pernas. A localização mais freqüente é a face, especialmente os dois terços superiores, não acometendo mucosas ou regiões palmo-plantares (GAMONAL, 2002).

2.1.2 – Formas Clínicas

Crowson (2006), Habif (2005) e Mélega (2002) descrevem as formas de apresentação clínica do CBC, chamam a atenção para dois aspectos comuns a todas as formas: a presença de telangectasias e o aspecto peroláceo. Caracteristicamente apresentam crescimento lento e raramente metastatizam. O tumor apresenta-se como lesão papulosa ou em placa, infiltrativo, da cor da pele, eritematoso e, às vezes, de coloração castanho escura.

As diferentes formas clínicas variam em aspecto e potencial maligno, sendo as mais freqüentes a nodular ou nóduloulcerativa, a superficial ou pagetóide, esclerodermiforme ou morfeiforme, o cístico e o pigmentado.

O nodular é a forma mais comum de CBC e apresenta-se como pápula ou nódulo peroláceo, com telangectasia, podendo ulcerar-se. O padrão de crescimento é irregular, formando uma massa oval, na qual a superfície pode se tornar multilobular. O centro freqüentemente ulcera, sangra e acumula crostas e escamas. A massa de tecido de um CBC nodular tem uma consistência distinta, que pode ser apreciada durante a biópsia ou curetagem.

Ela tem fraca coesão e colapsa ou se rompe quando manipulada com uma cureta, sendo esta uma característica diagnóstica importante. O diagnóstico diferencial inclui queratose seborréica, hiperplasia sebácea, tricoepitelioma solitário e pápula fibrosa.

O superficial é o menos agressivo, ocorrendo mais frequentemente no tronco e nas extremidades, mas também pode ocorrer na face. É uma lesão eritemato-escamosa, apresentando em geral, na periferia, micropápulas peroláceas. Inicialmente, o crescimento é radial, superficial, posteriormente, em profundidade, sendo, muitas vezes, de caráter multicêntrico. O diagnóstico diferencial deve ser feito com ceratose actínica, doença de Bowen, lupus eritematoso fixo, carcinoma espinocelular, eczema seborréico ou lesão eczematosa.

A forma esclerodermiforme, esclerosante ou morfeiforme tem localização mais freqüente na face, sendo o mais agressivo dos carcinomas basocelulares (MÉLEGA, 2002). É um tumor insidioso, possuindo características de superfície inócuas que podem mascarar seu potencial para extensão profunda e ampla. É um tumor firme, céreo, plano e levemente elevado, branco pálido ou amarelado, lembrando a esclerodermia localizada, daí o nome esclerodermiforme. As bordas são pouco distintas e confundem com a pele normal. As lesões podem lembrar uma cicatriz, quando se tornam deprimidas.

O CBC cístico é uma variante do nodular, aparecendo como uma massa lisa, redonda, cística. Tem o comportamento idêntico ao CBC nodular. Os CBCs podem conter melanina, que dá uma cor marrom, azulada ou negra a toda ou parte da lesão. Clinicamente, lembra um melanoma ou uma ceratose seborréica pigmentada, mas o exame clínico cuidadoso mostra uma borda caracteristicamente elevada, branca perolada e translúcida. O CBC pigmentado deve ter uma ou mais das seguintes seis características positivas: grandes ninhos ovóides cinza-azulados, múltiplos glóbulos cinza-azulados, áreas em folha de borda, áreas em “roda de carroça”, ulceração e telangectasia arboriforme. O mais comum do CBC pigmentado é ser uma variante do tipo nodular.

O CBC pode fazer parte de síndromes como: síndrome do nevo basocelular ou síndrome de Gorling, uma doença de herança autossômica dominante. Além da presença de múltiplos CBCs, o doente exibe malformações, como cistos maxilares, agenesia parcial do corpo caloso, fibromas ovarianos, calcificações da foice cerebral e malformações ósseas. Nas regiões palmo-plantares, há depressões pontuadas disceratóticas bastante características (MCKEE; CALONJE; GRANTER, 2005; MELEGA, 2002).

O CBC também compõe o quadro clínico de síndromes como: xeroderma pigmentoso e Síndrome de Basex. O xeroderma pigmentoso é uma doença genética na qual o portador não

consegue reverter as agressões que a radiação solar provoca no DNA das células cutâneas. Ainda na infância, apresentam uma grande quantidade de sardas e pele muito ressecada, que rapidamente se torna áspera e desenvolve ceratose actínica e lesões como CBC que só aparecem em idade mais avançada. A Síndrome de Basex, também congênita, caracteriza-se pela presença de várias lesões de face do tipo CBC, atrofia da derme folicular e pelos encravados (CROWSON, 2006; MELEGA, 2002).

2.1.3 - Características Histológicas

Tradicionalmente, o CBC tem sido classificado como sólido (indiferenciado) e aqueles que manifestam uma diferenciação específica (écrina, sebácea ou outras linhagens). Entretanto, apenas o padrão arquitetural de crescimento tem comprovado valor prognóstico de comportamento biológico. Assim a arquitetura é um aspecto crítico, enquanto que os padrões de diferenciação devem ser considerados somente quando houver necessidade de reconhecê-los como parte do espectro histológico do CBC e seu impacto no diagnóstico diferencial. A sua identificação como um carcinoma de Merkel, um carcinoma sebáceo, écrino ou uma neoplasia folicular constitui uma armadilha diagnóstica que carrega consigo o risco de um sobre ou subtratamento. A identificação do padrão arquitetural requer a completa excisão da lesão. Biópsias em *shave* ou com *punch* levam a uma taxa de erro intrínseca de amostra em torno de 20%, explicada pelo fato de que a transformação biológica do CBC tende a ocorrer na base e nos prolongamentos de crescimento da neoplasia (CROWSON, 2006).

Os CBCs indiferenciados são classificados em subgrupos de crescimento indolentes e agressivos. Compõem-se de ninhos de células basalóides com escasso citoplasma, que se projetam para a derme subjacente a partir da epiderme. A parte central de cada ninho contém queratinócitos basais epidérmicos normais e que mostram apoptose ocasional. A periferia de cada ninho exhibe uma camada organizada de queratinócitos colunares polarizados, com o eixo longo de cada célula perpendicular à zona da membrana basal circundante - “paliçada periférica” (ELDER *et al.*, 2005; FARMER; HOOD, 2000; HABIF, 2005; MCKEE, CALONZI; GRANTER, 2005).

Há cinco padrões histológicos principais: Nodular (21%) - formado por uma massa redonda de células neoplásicas com contornos periféricos bem definidos, exibindo paliçada periférica; Superficial (17%) - caracterizado por brotos de células basais atípicas que se

estendem a partir da camada basal da epiderme; Micronodular (15%) - formado por nódulos pequenos redondos de tumor, aproximadamente do tamanho de bulbos pilosos, estes são arredondadas, bem demarcados e exibem paliçadas periféricas; Infiltrativo (7%): os blocos tumorais variam em tamanho e tem conformação denteada; Esclerodermiforme (1%) - com numerosos e pequenos blocos, alongados, contendo poucas células que surgem como fitas ou cordões em estroma fibroso. Padrão misto, com dois ou mais tipos histológicos, está presente em 38,5% dos casos (ELDER *et al*, 2005; FARMER; HOOD, 2000; HABIF, 2005; MCKEE, CALONZI; GRANTER, 2005).

Os CBCs diferenciados podem mostrar uma variedade de linhagens celulares que não levam a impacto prognóstico. Estes incluem, mas não de forma restrita, o CBC queratótico, infundibulocístico, folicular, pleomórfico, com diferenciação écrina, com diferenciação sebácea, o fibroepitelioma de Pinkus e o CBC com diferenciação mioepitelial (CROWSON, 2006).

2.1.4- Fisiopatologia

O CBC deriva do epitélio basalóide localizado nos brotos foliculares em bulbos foliculares e células de matriz foliculares e células basalóides específicas da epiderme interfolicular. A origem destas células é atribuída a um progenitor epitelial pluripotente em adultos ou célula epitelial germinativa nos casos em que estas neoplasias ocorrem na infância. O CBC manifesta um perfil de queratina similar àquele da porção inferior do folículo piloso e que é, por isso, distinto do epitélio da camada epidérmica basal adjacente (CROWSON, 2006).

A radiação UV pode induzir mutação do p53; esse, quando mutado, é incapaz de retirar a célula do ciclo celular para que haja reparo do DNA e as células também não entram na via de apoptose (morte celular programada). As células adquirem, então, uma instabilidade genômica, que leva a um aumento do potencial maligno.

A resposta do hospedeiro ao tumor e a interação tumor-estroma são fundamentais para o crescimento tumoral. O exame ultra-estrutural dá algumas pistas da patogênese e transformações características do CBC. As variantes superficial e nodular são circundadas por uma zona de membrana basal contínua de colágeno tipo IV e V misturado à laminina. As variantes de crescimento agressivo (morfeiforme, metatípico e subtipos infiltrativos) não

apresentam membrana basal. Crowson (2006), em recente publicação, especula que a membrana basal atuaria como uma armadilha para citocinas derivadas das células tumorais, estromais e inflamatórias que freqüentemente circundam blocos tumorais. Seja qual for o evento envolvido, a interação entre o tumor e o estroma tem papel-chave na biologia do CBC (CROWSON, 2006; HABIF, 2005). O curso do CBC é imprevisível, pode crescer lentamente, particularmente em idosos, ou rapidamente e em surtos sucessivos com expansão e regressão tumoral parcial.

O surgimento do CBC pode estar associado a processos cicatriciais crônicos, como fístulas de osteomielite, cicatrizes de queimaduras e áreas de dermatite por radiação. O tumor surge após um período de três meses a sete anos ou mais, no local da lesão prévia. É também descrito ocorrência em indivíduos que receberam transplante de órgãos sólidos em que seqüências de DNA semelhantes às do herpes vírus são detectadas (ELDER *et al*, 2005; GAMONAL, 2002; HABIF, 2005; MCKEE; CALONJE; GRANTER, 2005; RUBIN; CHEN; RATNER, 2005; TILLI *et al*, 2005).

2.1.5- Tratamento

De acordo com Habif (2005), os portadores de CBC devem realizar um exame completo de pele uma vez por ano. Como o risco de um CBC subsequente diminui três anos após o primeiro tumor, a necessidade de vigilância continuada dos pacientes com um CBC que se mantêm livres de tumor por três anos provavelmente é limitada.

Alguns aspectos devem ser considerados no tratamento destes tumores, como, por exemplo, a idade e o resultado estético, sendo que os idosos aceitam melhor as cicatrizes; as condições clínicas do paciente; o número de lesões, ou seja, quando as lesões forem múltiplas, o tratamento clínico pode ser de escolha (McCARTHY, 1990; MÉLEGA, 2002; TILLI *et al*, 2005).

Vários métodos cirúrgicos e não cirúrgicos estão disponíveis para o tratamento do CBC. Apesar do fato de a excisão cirúrgica ser a terapia mais usada, terapias não invasivas como a terapia fotodinâmica ou a aplicação tópica de 5-fluoracil têm sido usadas com mais freqüência, em casos bem selecionados, especialmente devido ao melhor resultado estético (TILLI *et al*, 2005).

Os CBCs raramente dão metástases, porém, quando tratados cirurgicamente, podem causar no paciente uma destruição tecidual local, em alguns casos totalmente irreversível. Dai, fica a pergunta: para erradicar um tumor não metastatizante, é necessário erradicar até o último vestígio cirurgicamente? Uma recorrência da lesão pode ser facilmente tratada e poderá aparecer em apenas 5% das excisões cirúrgicas convencionais, com as chamadas margens livres (principalmente na variante morfeiforme). As terapias biológicas são bastante promissoras e podem ser adjuvantes nas excisões convencionais, permitindo que, no futuro, as cirurgias sejam mais conservadoras (TILLI *et al*, 2005).

Em recente publicação, Tilli *et al* (2005), abordando a etiologia molecular e a patogênese dos CBCs, consideram que muitos agentes antineoplásicos exercem seu efeito antineoplásico através da indução da apoptose. A susceptibilidade celular é bastante variável, sugerindo que existe limiar celular distinto para induzir a apoptose. Por exemplo, células do CBC que superexpressam IL-6 são resistentes ao RUV e a apoptose provocada pela terapia fotodinâmica. A superexpressão de Bcl-2 também tem sido ligada à resistência de vários cânceres a drogas quimioterápicas. O tratamento tópico com 5-fluoracil tem se mostrado muito eficiente, sendo a regressão do tumor provavelmente causada por aumento da apoptose nas células tumorais. O interferon alfa induz à apoptose e também é bastante efetivo no tratamento.

Fitoterápicos conhecidos por induzir à apoptose também estão sendo usados na terapia e prevenção do câncer. Entre os mais citados estão: a fração polifenólica do chá verde, extratos de chá preto e, mais recentemente, ajoene, principal componente do alho, que, além de atuar induzindo à apoptose, também suprime o Bcl-2.

Como o CBC mostra uma forte resposta inflamatória, recentes estudos têm buscado o efeito de componentes imunomoduladores. O mais promissor é o imiquimod, que intensifica a resposta de citocinas endógenas (entre outras o INF- α e IL-10), estimulando T-helper 1, mediador da resposta inflamatória. Os tumores são infiltrados por macrófagos e mostram uma resposta apoptótica intensa.

Uma vez que são considerados uma malignidade, a cirurgia radical parece estar justificada, principalmente nos tumores com um crescimento do tipo morfeiforme. Porém, a eficácia de compostos proapoptóticos e imunomoduladores para o tratamento de CBC pode mudar a terapia num futuro próximo. Para a maioria dos pacientes, a cirurgia poderá não mais ser a primeira opção de tratamento. Tumores que são normalmente ressecados com margem de segurança, um procedimento que pode resultar em mutilação, poderão ser tratados com

excisão primária limitada, seguida por terapia adjuvante usando um imunomodulador, um agente proapoptótico (TILLI *et al*, 2005).

Em resumo, o tratamento deve objetivar a destruição ou remoção total do tumor, preservação máxima do tecido normal, preservação da função e melhor resultado estético possível (McCARTHY, 1990; MÉLEGA, 2002; TILLI *et al*, 2005).

2.2- Ciclo Celular – Mecanismos reguladores e proliferação celular

Os estudos sobre proliferação celular têm estado em evidência nos últimos tempos devido às informações que podem dar sobre a biologia, diagnóstico e prognóstico dos tumores cutâneos e outros. O entendimento do ciclo celular e dos seus mecanismos reguladores é importante, devido ao fato de, nas neoplasias, existir uma grande quantidade de células em reprodução.

De acordo com Rabenhorst *et al* (1994), a proliferação celular é definida como aumento do número de células resultantes da complementação do ciclo celular, que nada mais é do que uma cascata de eventos que se processam de maneira ordenada, assegurando a duplicação fiel dos componentes celulares em uma seqüência lógica e a divisão destes componentes em duas células filhas (LEVINE *et al*, 1994; QUEIROZ, 1997).

O ciclo celular é composto de quatro fases: o período antes da síntese de DNA (G1), a fase de síntese de DNA (S), o período depois da replicação do DNA (G2) e a fase mitótica que culmina na divisão celular (AGUIAR, 1996; RABENHORST, BURINI, SCHMITT, 1994; LEVINE *et al*, 1994; QUEIROZ, 1997). Quando as células estão fora do ciclo celular, estão na fase G0, que se caracteriza pela quantidade idêntica de DNA vista na célula em G1, porém sem as macromoléculas necessárias à duplicação do DNA; em G0, as células podem permanecer um espaço de tempo indeterminado que pode ir de dias, semanas ou até anos (AGUIAR, 1996; QUEIROZ, 1997).

O andamento das fases do ciclo celular é realizado pela presença de limites que agem antes do começo da fase S ou M e se concluem quando ocorre a replicação do DNA antes da entrada de célula na mitose. O sistema de controle do ciclo celular é um dispositivo bioquímico operado ciclicamente através de proteínas-alvo, interagindo entre si, induzindo e coordenando os processos envolvidos na divisão dos conteúdos celulares (ALBERTS *et al*, 1994; QUEIROZ, 1997).

Um ponto essencial da regulação do ciclo celular é dado pelas proteínas quinase ciclina-dependente (CDK), cuja regulação por fosforilação é feita pelas ciclinas. As ciclinas são proteínas de ocorrência cíclica que são ativadas e degradadas no ciclo celular. Existem pelo menos duas classes de ciclinas, que são: as mitóticas que, em conjunto com as CDKs, formam o fator promotor de maturação ou mitose (MPF), capazes de controlar a entrada da célula na mitose, e as ciclinas G1, necessárias para entrada da célula na fase S. Já as proteínas CDK agem fosforilando resíduos de serina e trionina de proteínas-alvo (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005). Nesses pontos de checagem, várias condições são avaliadas, por exemplo, no ponto de controle G: o tamanho celular e a condição do meio celular.

O movimento das células que iniciaram o ciclo é controlado por hormônios, nutrientes e fatores de crescimento. Estes últimos estimulam a célula a proliferar através da ligação com receptores específicos, que, quando ativados, emitem um sinal de transdução via segundos mensageiros do citoplasma ao núcleo celular (RABENHORST; BURINI; SCHMITT, 1994).

Os mecanismos reguladores do ciclo celular, sua regulação com fatores de crescimento, oncogenes, genes supressores de tumor e as proteínas envolvidas com a progressão das diversas fases do ciclo celular constituem objeto de estudos variados no campo da biologia tumoral, visando à detecção e quantificação das células em proliferação; objetivando a obtenção de uma estimativa de crescimento celular com conseqüente repercussão no prognóstico e terapêutica dos mais variados tumores (RABENHORST; BURINI; SCHMITT, 1993).

As técnicas usadas para avaliação da cinética celular são complicadas, consomem tempo e necessitam de equipamentos especiais; enquanto a utilização de anticorpos dirigidos contra antígenos específicos expressos nas células proliferantes dos tumores oferece como vantagem permitir a análise simultânea da proliferação celular e da histologia dos mesmos (QUEIROZ, 1997).

Dentro do contexto de identificação das células em proliferação, algumas proteínas envolvidas com a fase replicativa do DNA têm sido utilizadas como marcadores de proliferação celular, valendo destaque para o PCNA e o antígeno K1-67. A avaliação destes marcadores fornece a possibilidade de investigação de tumores humanos de maneira simplificada, rápida e pouco dispendiosa (RABENHORST; BURINI; SCHMITT, 1993; RABENHORST; BURINI; SCHMITT, 1994).

2.3- Oncogênese

A evolução de uma célula normal para uma célula maligna envolve um processo relacionado com dano ao genoma. Existem basicamente quatro tipos de genes envolvidos na patogênese do câncer, que são: os oncogenes, os genes supressores de tumor, os genes relacionados à apoptose e os genes de reparo do DNA. O desenvolvimento do câncer envolve dois mecanismos básicos: mutações que aumentam a atividade das proteínas codificantes, os chamados oncogenes e mutações que inativam a função de um gene, o chamado gene supressor de tumor. Os oncogenes podem ser classificados em fatores de crescimento, receptores dos fatores de crescimento, proteínas sinalizadoras, fatores transcricionais nucleares e ciclinas cinases dependentes (FARIA, 2002).

As células normais habitualmente necessitam do estímulo de fatores de crescimento, os quais se ligam aos receptores específicos, desencadeando uma série de reações que culminam com a proliferação celular. Esses fatores incluem o fator de crescimento epidérmico (EGF), fator α (alfa) de crescimento de tumor (TGF- α) e o fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF). As células neoplásicas providenciam mecanismos que permitem a ativação constante dos fatores de crescimento, que resultam em estímulo mitogênico continuado (FARIA, 2002).

O objetivo final dos oncogenes é a ativação de fatores de transcrição como a ciclina D, para que ocorra a fosforilação do produto do gene retinoblastoma (*pRb*) e assim iniciar a divisão celular. Entre os genes supressores de tumor, destaca-se o *p53*, que é considerado o “guardião do genoma”, pelas inúmeras funções celulares que controla, destacando-se: ativação inadequada de oncogenes, controle da observação de quebra nas fitas de DNA e de insuficiência de nucleotídeos para síntese de DNA. A ativação da *p53* como fator de muitos genes envolvidos no reparo do DNA induz à parada em G1 e apoptose. A importância do papel desempenhado pelo *p53* fica evidenciada pelo fato de que mais de 79% das neoplasias malignas do ser humano apresentam alterações deste gene (DANIEL, 2000; FARIA, 2002).

2.4 – Apoptose

Nas últimas duas décadas, o estudo da morte celular programada, ou apoptose, vem sendo desenvolvido por sua importância na determinação dos mecanismos patogênicos das doenças hematológicas e neoplasias malignas. A regulação da apoptose envolve uma linha complexa de proteínas supressoras e efectoras, atuando em diversas vias, e é um balanço entre esses elementos que levará à destruição celular, ou à resistência à morte celular programada (FARIA, 2002).

Através da microscopia eletrônica, várias alterações bioquímicas e morfológicas da apoptose já foram bem definidas. Inicialmente ocorre redistribuição dos poros da membrana nuclear e, posteriormente, condensação da cromatina, com degradação do DNA por endonucleases em fragmentos regulares de 180 a 200 pares de bases, os quais correspondem aos nucleossomos. A fragmentação do DNA internucleossomal reflete a degradação proteolítica de polipeptídeos intracelulares realizada por enzimas proteolíticas denominadas caspases (nome derivado de cisteína-protease) (KUMAR e FAUSTO, 2005).

Existem duas vias pelas quais a célula é induzida à apoptose, a via interna relacionada principalmente à atividade mitocondrial e liberação do citocromo c, e via externa, desencadeada pelo estímulo de receptores na superfície da membrana celular (FARIA, 2002; KUMAR e FAUSTO, 2005). Vários receptores de membrana foram identificados como sinalizadores de morte celular, entre os quais a família Fas (CD95) e receptor tipo I do fator necrosante de tumor (TNFR1) que é mais proeminente. Esses receptores podem ser ativados por ligação cruzada do ligante de Fas (Fas-FasL), levando à trimerização, como o agrupamento da molécula adaptadora “Fas-associated death domain” (FADD), a procaspase-8 é então ativada por oligomerização e autoclivagem, levando à ativação seqüencial a jusante das caspases efectoras (FARIA, 2002; KUMAR e FAUSTO, 2005).

As caspases podem também ser ativadas por via mitocondrial, e o processo envolve a procaspase 9. A interação do Bax (gene de proteína X associada ao Bcl-2) com o Bid (gene de domínio de interação B43 da família Bcl-2) causa oligomerização do Bax e o insere na membrana mitocondrial, desencadeando a liberação do citocromo c e de outras proteínas mitocondriais. Uma vez no citoplasma, o citocromo c se liga ao fator 1 ativador da apoptose - Apaf-1 (*apoptosis activating factor-1*), esse complexo ativa a procaspase 9, com clivagem

subseqüente da caspase-3, caspase-6 e caspase-7 (FARIA, 2002; KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005).

Recentemente, foi descoberto um mecanismo de interação entre a via extrínseca e a via mitocondrial de ativação das caspases. Esse mecanismo promove a ativação do Bax, levando à liberação de citocromo c pela mitocôndria e ativação da procaspase 9 (FARIA, 2002; KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005; O`GORMAN; COTTER, 2001).

2.5- Marcadores Tumorais

Na pesquisa de estratégias de prevenção e diagnóstico do câncer, tem ocupado lugar de destaque a busca de marcadores tumorais mais sensíveis que indiquem a transformação maligna precoce. A utilização de marcadores imunistoquímicos de proliferação celular aplicados à patologia das neoplasias permite a compreensão das alterações morfológicas ocorridas no processo de transformação neoplásica.

Em 1996, Aguiar relatou que um indicador da carcinogênese precoce é o aumento da atividade proliferativa do tecido transformado e que, graças aos avanços obtidos nos métodos de estudo da proliferação celular e ao maior conhecimento sobre os mecanismos de controle do ciclo celular, a atividade proliferativa pode hoje ser facilmente avaliada em material rotineiramente processado através de métodos imunistoquímicos.

2.5.1- p53

p53 é o principal gene relacionado às neoplasias humanas, que, segundo Souza *et al* (2004), está alterado em cerca de 50% de todos os tipos de cânceres originados em uma grande variedade de tecidos.

Localizado no braço curto do cromossomo 17, esse gen codifica uma fosfoproteína nuclear de peso 53KDa que regula a proliferação e a morte celular. Essa proteína, quando acumulada na célula, promove a parada do ciclo celular na fase G1, permitindo que possíveis danos ao DNA causados por agentes que levam a mutações gênicas sejam reparados (FIELD *et al*, 1993).

Se, por algum motivo, esse mecanismo falha, a p53 induz a célula à apoptose, impedindo, portanto, que células que sofreram mutações proliferem (AGUIAR, 1996; LEVINE *et al*, 1994; PARK *et al*, 2004; SOUZA *et al*, 2004; STRATIGOS *et al*, 2005).

Foi demonstrado que a deficiência no mecanismo da apoptose pode predispor o indivíduo a ter câncer de pele, e esta capacidade do p53 provavelmente se dá através de sua função na transcrição gênica. O p53 normal se liga ao DNA e é capaz de transativar ou transsuprimir a transcrição de outros genes (LIN *et al*; 2003).

Se, por um lado, o significado das alterações do p53 no prognóstico do câncer não esteja completamente claro, por outro, elas nos permitem predizer o risco de malignização de uma determinada lesão. Isso se deve ao fato de que o p53 possui uma meia-vida bastante curta, sendo detectada somente quando da presença de alterações de sua morfologia, levando a um considerável aumento da sua meia-vida (AGUIAR, 1996; SOUZA *et al*, 2004; TWEDDLE *et al*, 2001). Dos vários métodos usados para avaliar a expressão do p53 em neoplasias humanas, a análise dos níveis da proteína no tecido neoplásico é considerada o melhor procedimento, desde que o conteúdo protéico seja o ponto final da expressão gênica, e sabemos que este é o mecanismo pelo qual a função do gene é efetuada.

A identificação imunistoquímica do p53 tem sido associada a uma grande variedade de neoplasias malignas humanas, sendo que a sua detecção pode ser útil como marcador de malignidade e de possível pré-malignidade (BATINAC *et al*, 2004).

Em 1994, Rabenhorst mostrou que a imunorreatividade do p53 foi observada no epitélio hiperplásico adjacente ao tumor cutâneo e Campbell *et al*, em 1993, já haviam mostrado esta imunorreatividade em queratinócitos aparentemente normais nas margens de carcinoma de pele “in situ”, sugerindo que isso pode representar um evento precoce no processo de transformação maligna.

A expressão da p53 nas lesões proliferativas cutâneas, incluindo lesões benignas, tais como ceratose actínica e ceratoacantomas, evidenciam que a mutação do p53 causada pela radiação ultravioleta proporciona a transformação maligna precoce e indica o grau de malignidade (BATINAC *et al*, 2004; HELANDER; PETERS; PITTELKOW, 1993; KERSCHUMANN; McCALMONT; LEBOIT, 1994; NAGANO e ICHIHASHI, 1993; STRATIGOS *et al*, 2005; WIKONKAL *et al*, 1997).

2.5.2- PCNA

O antígeno nuclear de células proliferativas (PCNA) foi descrito independentemente em 1978, por Miyachi, Fritzler e Tan, que o identificaram através de um auto-anticorpo encontrado em pacientes com Lupus Eritematoso Sistêmico, em estudo da síntese de macromoléculas durante o ciclo celular de células HeLa, que constituem um exemplo clássico de linhagem celular imortalizadas (MIYACHI; FRITZLER; TAN, 1978; RABENHORST; BURINI; SCHMITT, 1993). O aparecimento cíclico deste antígeno ao longo do ciclo celular fez com que ele fosse designado PCNA / ciclina, embora não guarde nenhuma homologia com as clássicas ciclinas do ciclo celular (KURSKI *et al*, 1986).

O PCNA foi identificado como um fator auxiliar da polimerase delta, sendo essencial para a síntese de DNA e, portanto, para a progressão do ciclo celular. Embora esteja presente em todas as fases do ciclo celular, um aumento de três vezes na sua síntese ocorre na fase S (HARRISON; REYNOLDS; ROWLANDS, 1993).

A avaliação da proliferação celular com o emprego do PCNA é compatível com os métodos tradicionais e, por vezes, até superior a métodos como a citometria de fluxo. O processamento e a fixação podem influenciar na qualidade da reação imunoistoquímica do antígeno PCNA, o que pode propiciar coloração de fundo e gerar alguns problemas na quantificação da marcação. Porém, alguma variação na intensidade de marcação pode ser explicada pela própria diferença no nível de expressão desse antígeno durante as fases do ciclo celular (SOUZA *et al*, 2004).

A disponibilidade comercial de anticorpos monoclonais anti-PCNA com capacidade de reagir com epítomos antigênicos resistentes à fixação facilita grandemente o seu emprego em materiais colhidos rotineiramente ou de arquivos, o que lhe confere vantagens sobre outro marcador, o Ki-67, em estudos clínicos e experimentais (QUEIROZ, 1997; RABENHORST; BURINI; SCHMITT, 1993; SOUZA *et al*, 2004).

Li, Browne e Matthews (1995) e Toth, Guenther e Shum (1996) demonstraram que o PCNA pode ser uma boa alternativa para o estudo da proliferação celular em materiais emblocados, permitindo a identificação de compartimentos de proliferação dentro dos tumores e, além disso, afirmaram que a imunorreatividade do PCNA tem mostrado correlação com o prognóstico de tumores e se mostrado particularmente útil em casos em que é difícil se prever o curso clínico a partir do quadro histológico.

Além de ser observada uma diferença significativa entre os índices de PCNA nas lesões cutâneas benignas, como as leucoplasias e, nas malignas, tais como os carcinomas, é relatada uma redução significativa nos índices de PCNA nos carcinomas após quimioterapia e que a resposta das neoplasias aos agentes quimioterápicos pode ser estimada através de medidas conservadoras, com o PCNA. Foi identificada também uma forte correlação entre atipia e a expressão suprabasal do PCNA (HUANG *et al*, 1994; SHIN *et al*, 1993).

Já na carcinogênese cutânea induzida pela radiação ultravioleta, se observa que a expressão do PCNA em queratinócitos de pele exposta ao sol é maior na camada suprabasal do que na basal e está associada com a progressão para câncer de pele. No epitélio normal e nas lesões hiperplásicas, o PCNA se expressa apenas na camada basal, enquanto que expressão suprabasal foi observada em todas as displasias, carcinomas “in situ” e invasivos (AGUIAR, 1996).

Em 1993, Shin verificou que a expressão do PCNA no epitélio normal é observada apenas na camada basal, porém, no epitélio normal localizado próximo a carcinomas de cabeça e pescoço, a expressão do PCNA tem sido relatada tanto na camada basal quanto na parabasal do epitélio.

A expressão do PCNA avaliado por métodos imunistoquímicos está correlacionada com atividade mitótica, gradação histológica e comportamento clínico de alguns tumores (QUEIROZ, 1997). Portanto, sem conhecer o exato momento do ciclo celular, não é possível determinar se o elevado número de células PCNA positivas em uma neoplasia é fruto do alto “turnover” ou se indica uma grande proporção de células dividindo-se em prolongado ciclo celular.

A longa vida do PCNA, de aproximadamente 20h, poderia justificar o porquê de as células fora do ciclo celular permanecerem positivas durante certo período de tempo. Níveis elevados de PCNA podem, também, refletir o processo de reparo do DNA (ARISAWA *et al*, 1999).

2.5.3- Ki-67

A natureza molecular do antígeno identificado pelo Ki-67 permanece desconhecida. Sabe-se que corresponde ao produto de uma seqüência gênica que codifica uma proteína não histônica de massa molecular aparente de 345-395 KDa (AGUIAR, 1996; RABENHORST;

BURINI; SCHMITT, 1993). O antígeno é expresso durante todo o ciclo celular, exceto em G1 precoce, estando ausente de células em G0. A sua expressão aumenta na segunda metade da fase S, alcançando o máximo em G2 e M (ISOHERRANEN *et al*, 1999). Este anticorpo monoclonal foi assim designado por ter sido produzido na Universidade de Kiel na Alemanha, sendo que o clone produtor foi detectado na 67^a placa de cultura de tecido (BROWN; GATTER, 1990).

As taxas de avaliação do índice de proliferação celular, usando anticorpos monoclonais Ki-67 encontrados comercialmente, são compatíveis com aquelas dos métodos tradicionais, e alguns estudos têm demonstrado correlações entre a marcação com Ki-67 e o grau de malignidade e outros aspectos prognósticos em vários tipos de neoplasias, incluindo carcinoma de mama, melanomas e linfomas (ARISAWA *et al*, 1999). Entretanto, há evidências de que o tratamento de células com agentes citotóxicos, como a aduamicina e a hidroxiuréia, diminui o nível antigênico deste marcador, e células com carência nutricional (que não são incomuns nos tumores) podem ter imunorreatividade discrepante em relação aos outros parâmetros de proliferação celular (RABENHORST; BURINI; SCHMITT, 1994).

O Ki-67 apresenta vida média de menos de uma hora, sendo que o cromossoma 10 parece estar envolvido na expressão da proteína que apresenta íntima associação com o ciclo celular (AGUIAR, 1996). Daí a limitação do emprego do Ki-67 monoclonal na rotina laboratorial, sendo necessários tecidos frescos ou congelados, já que o epítipo reconhecido por ele é destruído pela fixação, impossibilitando assim a sua utilização em material embocado em parafina. Porém, o Ki-67 policlonal é dirigido contra peptídeos recombinantes do Ki-67 e pode ser usado em material processado rotineiramente, desde que a recuperação antigênica através da irradiação por microondas seja empregada (GERDES *et al*, 1992; KUBBUTAT *et al*, 1994; ROSE; MARDOX; BROWN, 1994).

Já Skalova *et al* (1994) afirmaram que a imunoistoquímica para o Ki-67 é um método fácil para a avaliação da fração de crescimento das neoplasias humanas e fornece informação prognóstica valiosa sobre a doença.

2.5.4- Bcl-2

O gene *Bcl-2*, localizado no braço longo do cromossomo 18, codifica uma proteína de mesmo nome (*Bcl-2*) capaz de inibir a apoptose. A expressão anormal da *Bcl-2* numa célula geneticamente alterada contribui para a expressão clonal da célula danificada por interromper a apoptose, levando a célula à imortalização (SOUZA *et al*, 2004; VERHAEGH *et al*, 1995).

Tilli *et al* (2005), relatam que esta proteína está associada com as membranas da mitocôndria, retículo endoplasmático e núcleos e carrega sete locais de fosforilação, dos quais ser-70 (*locus* cromossomial) é crítico para a função de supressão da apoptose, exercida pelo *Bcl-2*. Um grande número de proteínas relacionadas à *Bcl-2* tem sido isolado, as quais podem agir como indutoras da apoptose (por exemplo, Bax, Bcl-x) ou agente supressor da apoptose (*Bcl-xl*). Heterodinamização entre os membros dessas famílias determina se a célula morrerá ou não (LIU *et al*, 1991).

Rodriguez-Villanueva *et al*, em 1995, concluíram em seus estudos sobre a expressão do *Bcl-2* na pele normal e em câncer cutâneo não melanoma, que existe possibilidade de a desregulação do gene *Bcl-2* contribuir para a patogênese de certos cânceres cutâneos não melanoma. Os achados sugeriram que a expressão do *Bcl-2* pode predispor o queratinócito basal à transformação maligna via inibição da apoptose.

Alterações do *Bcl-2* podem ser detectadas em 50% das neoplasias humanas, enfatizando a importância da inibição da apoptose na carcinogênese cutânea (MORALES-DUCRET *et al*, 1995; RODRIGUES-VILLANUEVA *et al*, 1995; SOUZA *et al*, 2004).

A *Bcl-2* aumenta consideravelmente a sobrevivência das células, facilitando permanentemente mutações e transformações malignas. Souza *et al* em 2004 relataram parecer ser possível que a hiperexpressão da *Bcl-2* aumente a resistência da célula à apoptose, tornando-a menos susceptível ao tratamento. Estes autores também observaram mutações do *Bcl-2* em 17% de cânceres cutâneo-mucosos estudados. Não se achou, porém, correlação estatística significativa entre a presença da *Bcl-2* e o sexo dos pacientes, tamanho do tumor ou ocorrência de metástases regionais (SOUZA *et al*, 2004).

Huang, em 2000, concluiu que as proteínas da família *Bcl-2* são a chave reguladora da apoptose, sendo importantes para o desenvolvimento de uma nova geração terapêutica para tratamento do câncer.

3- OBJETIVOS

O objetivo geral é avaliar a expressão de marcadores de proliferação celular e apoptose em lesões de pele de pacientes portadores de CBC dos tipos nodular, morfeiforme e superficial e indivíduos livres de CBC.

Os objetivos específicos são:

- Avaliar por técnicas histopatológicas amostras de pele dos pacientes com CBC e indivíduos livres de CBC;
- Avaliar a expressão dos marcadores p53, Bcl-2, PCNA e Ki-67 através da imunistoquímica;
- Correlacionar a expressão destes marcadores com os indicadores histológicos de gravidade do tumor e a expressão destes marcadores em indivíduos livres de CBC.

4- METODOLOGIA

4.1- Pacientes e Controles

Foram estudadas cinco lesões de pele de pacientes portadores de CBC nodular, cinco com CBC morfeiforme e cinco com CBC superficial, já submetidos à cirurgia e com o diagnóstico anatomopatológico confirmado. O grupo controle contém três indivíduos normais submetidos à cirurgia estética de pálpebras (blefaroplastia) e livres de lesões (Anexo I). Todos os indivíduos foram submetidos à cirurgia na Plastic Center, após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O projeto tem aprovação nº 277/2005 do Comitê de Ética em Pesquisa da UFJF.

4.2 – Coleta do material

Amostras foram selecionadas dos casos de CBC nodular, morfeiforme e superficial, com diagnóstico anatomopatológico previamente estabelecido. Amostras sem evidências de CBC serão obtidas da pele em excesso, retirada durante o procedimento de cirurgia estética das pálpebras.

4.3- Análise Histológica

As amostras de pele removidas durante procedimento cirúrgico foram fixadas em formol a 10% e, posteriormente, submetidas ao processamento histológico de rotina. O material embocado em parafina foi então submetido à microtomia, obtendo-se cortes com espessura de 3-5 μ . Os cortes foram corados pelo método de Hematoxilina e Eosina (H.E) e submetidos à análise microscópica para diagnóstico anatomopatológico.

4.4- Avaliação Imunoistoquímica

Foi avaliado o envolvimento de proteínas apoptóticas e de proliferação celular no carcinoma basocelular, utilizando a reação de imunoistoquímica para a detecção das proteínas Bcl-2, p-53 (antiapoptóticas) e PCNA e Ki-67 (proliferação celular).

Em linhas gerais, este método compreende as seguintes etapas: (1) desparafinização e reidratação dos cortes de pele; (2) bloqueio da peroxidase endógena com H₂O₂ a 3%; (3) recuperação antigênica em alta temperatura com tampão citrato 0,01 M pH 6,0; (4) incubação com anticorpos primários monoclonal (Tabela 1); (5) incubação com anticorpo secundário biotilado (Sistema de Detecção Universal EP-USA - Easy Path[®]); (6) incubação com o complexo Streptoavidina-Biotina Peroxidase; (7) revelação utilizando-se o substrato cromógeno diaminobenzidina (DAB); (8) contracoloração com Hematoxilina de Harris e (9) desidratação e montagem das lâminas para análise em microscopia óptica.

Foram utilizadas como controles positivos para os marcadores Bcl-2, PCNA e Ki-67 lâminas contendo cortes de tonsilas palatinas e, para o p-53, lâminas contendo cortes de carcinoma de mama.

Em face da baixa positividade de alguns marcadores, foi estabelecido pela análise descritiva da expressão de todos os marcadores, usando o critério de cruces. A classificação variou de zero a quatro cruces (4+), sendo o critério assim definido para p53, Ki-67 e PCNA: na observação de um campo microscópico com aumento de 200x, se todos os núcleos estavam marcados, foi classificado como quatro cruces (4+); se alguns poucos núcleos não apresentavam marcação, três cruces (3+); se metade deles não apresentava a coloração, duas cruces (2+); alguns poucos corados foi classificado como uma cruz (1+) e a ausência total de marcação.

Para o Bcl-2, como a marcação é citoplasmática e linear ao redor da membrana celular externa, a mesma observação foi usada e seguido o mesmo critério da marcação nuclear.

Tabela 1: Anticorpos primários utilizados na Reação de Imunoistoquímica

Especialidade	Clone	Diluição	Tempo Incubação
Bcl-2*	D5	1:100	18 horas
p53*	DO-7	1:100	18 horas
Ki-67*	MM-1	1:200	18 horas
PCNA*	PC-10	1:400	18 horas

*NOVOCASTRA LABORATORIES LTD.

4.5- Tratamento Estatístico

Utilizamos o teste não paramétrico de Mann Whitney para avaliar a significância da expressão dos marcadores de apoptose e proliferação celular, de acordo com a gravidade do CBC.

5 – RESULTADOS

5.1 – Avaliação do perfil histopatológico

As amostras coradas pelo método de rotina Hematoxilina Eosina (HE) foram analisadas à microscopia óptica, utilizando microscópio Olympus modelo BX40; os achados, descritos conforme os aspectos histopatológicos encontrados e incluídos em três padrões de apresentação de CBC e as amostras utilizadas como controle (ausência de CBC), descritas de acordo com as alterações evidenciadas.

O grupo contendo CBC superficial apresenta proliferação de células basalóides atípicas que formam um eixo paralelo à superfície epidérmica, a partir da basal, formando múltiplos focos de crescimento tumoral. Os blocos estendem-se ocasionalmente além da derme papilar. O estroma circunjacente é fibromixóide. Uma fenda entre o limite dos blocos tumorais e o estroma é observada. Há elastose actínica peritumoral (Fig. 1A).

A variante nodular é formada por blocos lobulados, arredondados, conectados à epiderme suprajacente por delicados cordões ou largas trabéculas. Os blocos mostram variação de tamanho e forma de discreta a moderada, com disposição celular periférica em paliçada característica. As células tumorais são de tamanho uniforme, forma poligonal, geralmente com núcleo oval e nucléolo inconspícuo. Excepcionalmente núcleos fusiformes ou displásicos são observados. O citoplasma é escasso e anfófilo, atividade mitótica é variável (0 a 2 p/c 400x). O estroma é fibromixóide e caracteristicamente exhibe retração dos blocos celulares com formação de fenda (Fig. 1B).

O grupo de CBC com padrão morfeiforme é constituído por blocos de células neoplásicas comprimidas pelo estroma em cordões adelgaçados, que comumente se ramificam. Frequentemente, cordões unicelulares são observados e, em função desta disposição dos blocos tumorais, o fenômeno em paliçada quase nunca é visto e a retração estromal inconspícuo. O estroma é hipocelular, densamente colageinizado. Múltiplos cortes podem ser necessários para demonstrar a ligação dos blocos neoplásicos com a epiderme. Em alguns casos, foi observado invasão profunda da derme e, por vezes, da hipoderme. A epiderme suprajacente, em alguns casos, era atrófica (Fig. 1C).

O tecido palpebral livre de CBC apresenta alterações decorrentes do envelhecimento e exposição solar, ou seja, atrofia e elastose solar, sem atipias epiteliais (Fig. 1D).

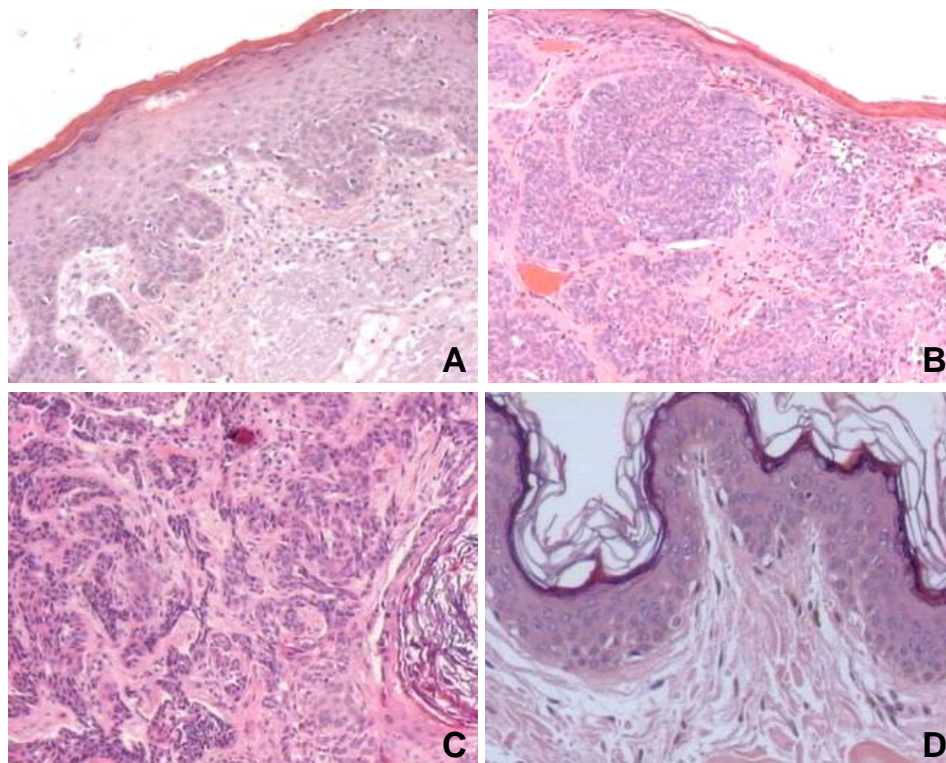


FIGURA 1:

- A) CBC superficial, HE (100X). Proliferação de células basalóides, formando múltiplos focos de crescimento tumoral, a partir do basal.
- B) CBC nodular, HE (100X). Blocos lobulados, arredondados, conectados à epiderme suprajacente. Formação de fenda por retração dos blocos tumorais.
- C) CBC morfeiforme, HE (100X). Blocos de células neoplásicas, comprimidas pelo estroma, em cordões adelgaçados. Ausência de retração estromal.
- D) Corte de pele palpebral superior, HE (100X).

5.2- Avaliação dos marcadores p-53, Bcl-2, Ki-67 e PCNA por imunoistoquímica

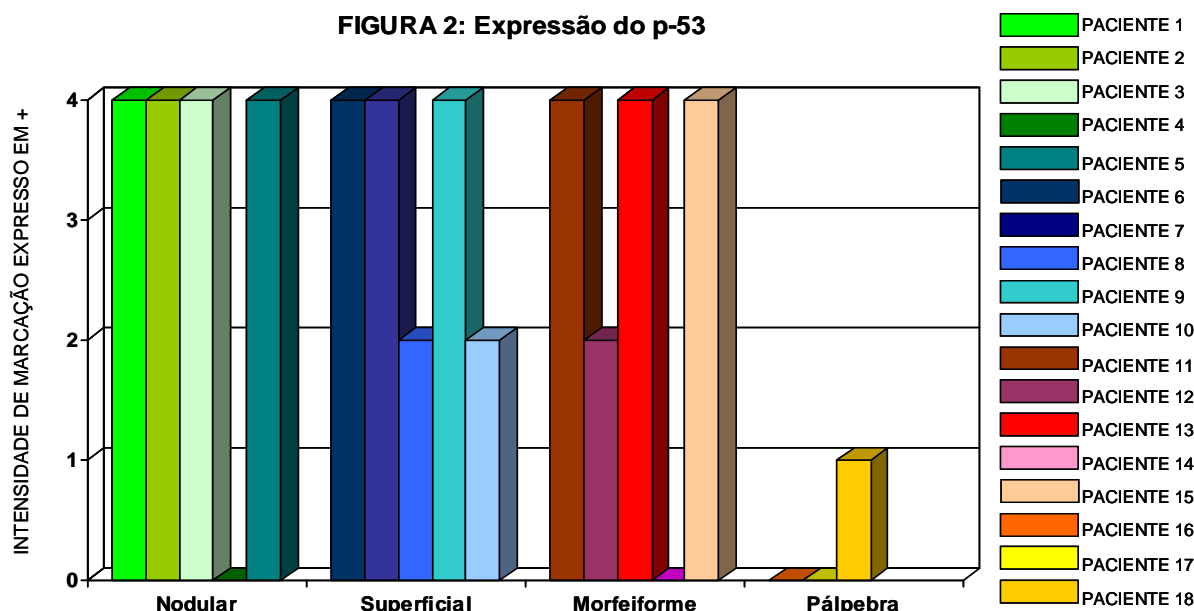
Foram testados, em todos os pacientes, os marcadores de apoptose (p53, Bcl-2) e proliferação celular (Ki-67 e PCNA). Foram consideradas positivas as reações estritamente nucleares para os marcadores p53, PCNA e Ki-67. Para o Bcl-2, foi considerada positiva a marcação citoplasmática, por estar relacionado ao retículo endoplasmático e mitocôndria, ou seja, citoplasma.

5.2.1- p-53

As células que exibiram marcação apresentaram uma coloração acastanhada e restrita ao núcleo celular. A expressão da proteína p-53 foi bastante semelhante em todas as variantes do Carcinoma Basocelular (Fig. 2), sendo maior a sua expressão na variante nodular, onde 80% dos pacientes expressaram 4+ e 20% deles não expressaram este marcador.

O tipo Morfeiforme expressou em 60% dos indivíduos como 4+ e, em 20%, como 2+ e não sendo expresso em 20% dos pacientes com esta variante, como ocorreu na Nodular. Nos casos de CBC Superficial, 60% das amostras foram positivas em 4+, porém 40% delas não expressaram a p-53 (Fig. 3 A, B, C).

Nas amostras de pele palpebral, não ocorreu qualquer expressão (Fig.3D). O controle positivo, conforme indicado pelo laboratório, foram lâminas contendo cortes de carcinoma mamário, para confirmar a efetividade das reações (Fig.4)



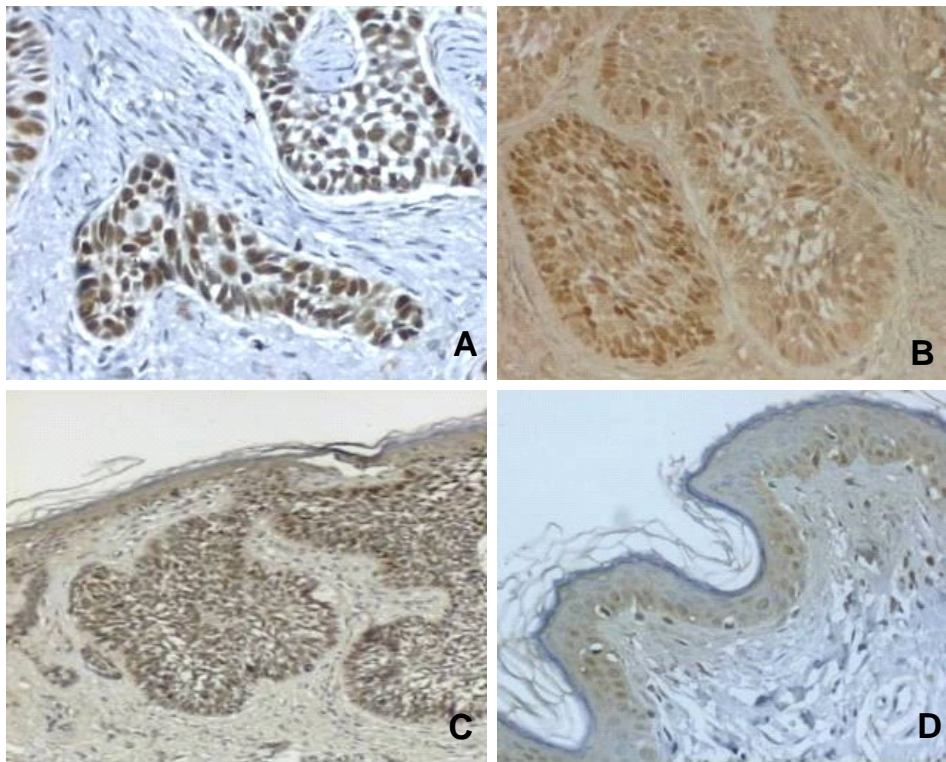


FIGURA 3

A) Expressão em 4+ do p-53 em CBC morfeiforme (200X).

B) Expressão em 4+ do p-53 em CBC nodular (200X).

C) Expressão em 2+ do p-53 em CBC superficial (200X).

D) Expressão em 1+ do p-53 em corte de pálpebra superior (200X).

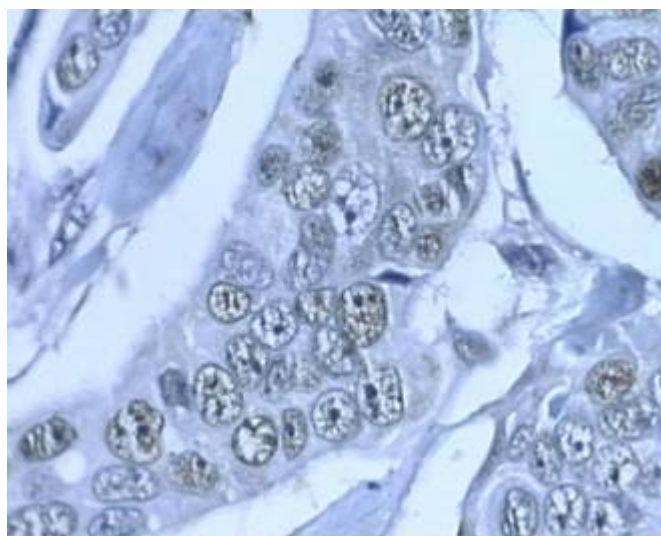


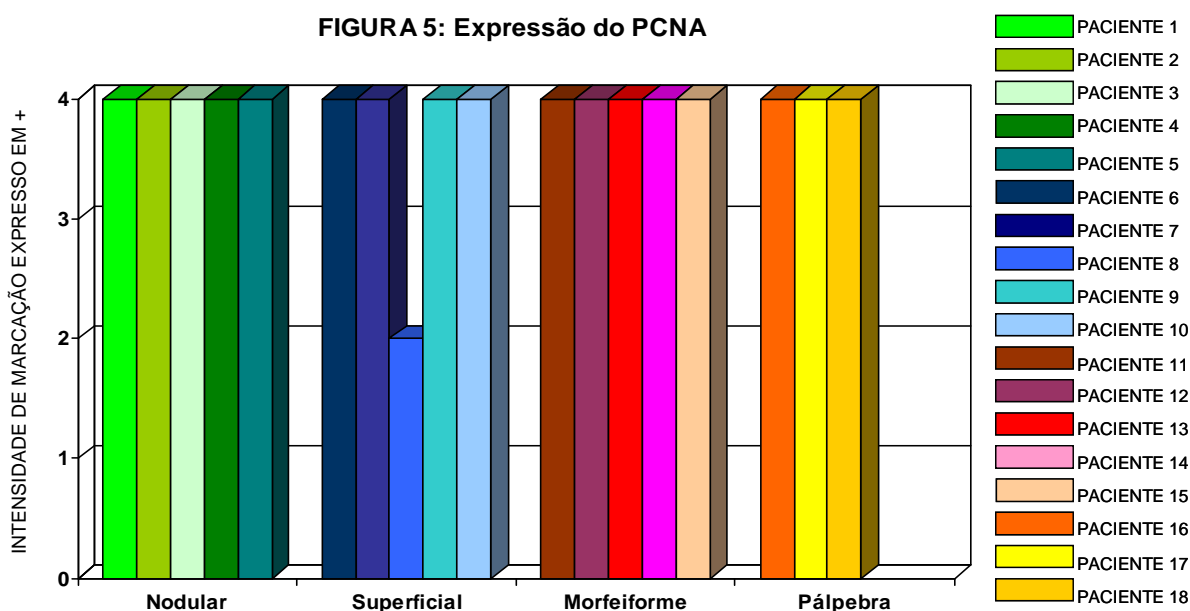
FIGURA 4: Corte de tecido mamário (controle positivo do p-53) (400X)

5.2.2- PCNA

A expressão do PCNA em todos os tipos de CBC estudados ficou circunscrita ao núcleo celular e exibiu uma coloração acastanhada, granular e bastante delicada, sendo que, em alguns casos, podia-se também ver uma marcação citoplasmática, não sendo levado em conta como expressão do PCNA (Fig. 5).

Nas variantes nodular e morfeiforme, ocorreu uma expressão de 4+ em todas as amostras, ou seja, todas as células tumorais tiveram os seus núcleos marcados. Já no CBC superficial, apenas em 80% houve expressão de 4+, ficando 20% das amostras com expressão de 2+ (Fig. 6 A, B, C).

Em 60% das amostras cutâneas controles, ocorreu uma marcação de todas as células da camada basal, sendo que, nos 40% restantes, não se expressou (Fig. 6 D). Lâminas contendo cortes de tonsilas palatinas foram usadas como controle positivo, confirmando as reações (Fig. 7).



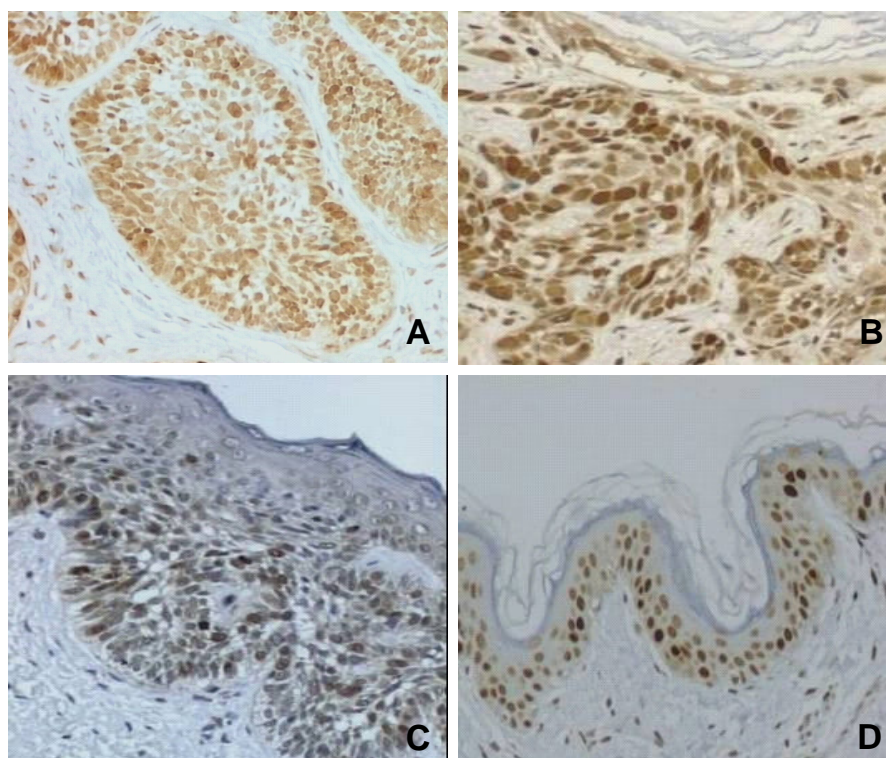


FIGURA 6

A) Expressão em 4+ do PCNA em CBC nodular (200X).

B) Expressão em 4+ do PCNA em CBC morfeiforme (200X).

C) Expressão em 4+ do PCNA em CBC superficial (200X).

D) Expressão em 4+ do PCNA em pele palpebral sadia em células da camada basal e parabasal (200X).

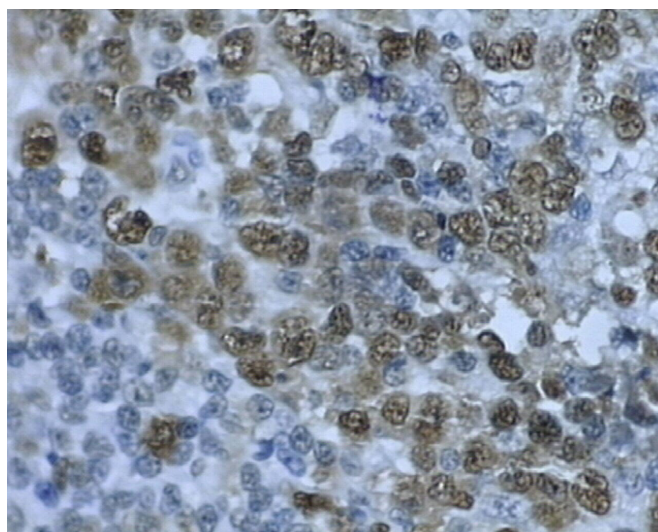


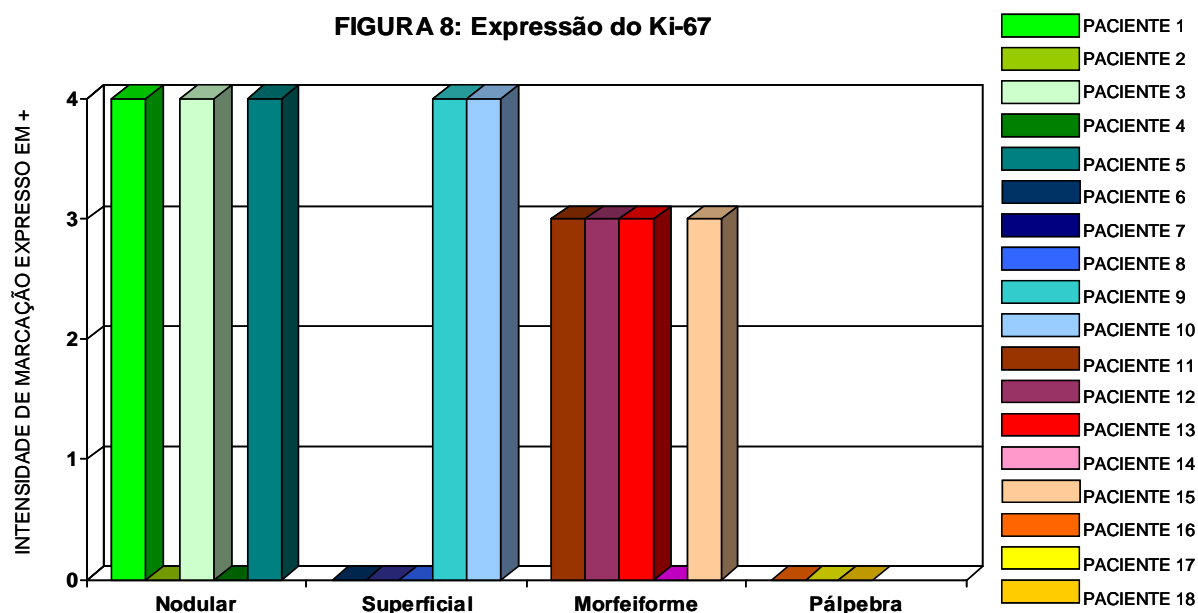
FIGURA 7: Corte de tonsila palatina usada como controle positivo para o PCNA (400X)

5.2.3- Ki-67

O Ki-67 mostrou um padrão de marcação, também granular de cor acastanhada ou amarronzada, sendo mais escuro nas células com atipias ou mitoses.

Nos CBC dos tipos nodular e superficial, ocorreu uma marcação de 4+ em 60% e 40% dos casos respectivamente e não houve expressão deste marcador em 40% dos casos do tipo nodular e 60% do superficial (Fig. 8, Fig. 9 A, B).

Já na variante morfeiforme, a expressão ocorreu em todos os casos, porém com pequena intensidade, ou seja, 80% apresentaram expressão apenas de 3+ e 20% apenas 1+ (Fig. 9C). Nos controles palpebrais, não ocorreu qualquer expressão deste marcador (Fig. 9D). A confiabilidade das reações foi testada usando lâminas com cortes de tonsilas palatinas (Fig. 10).



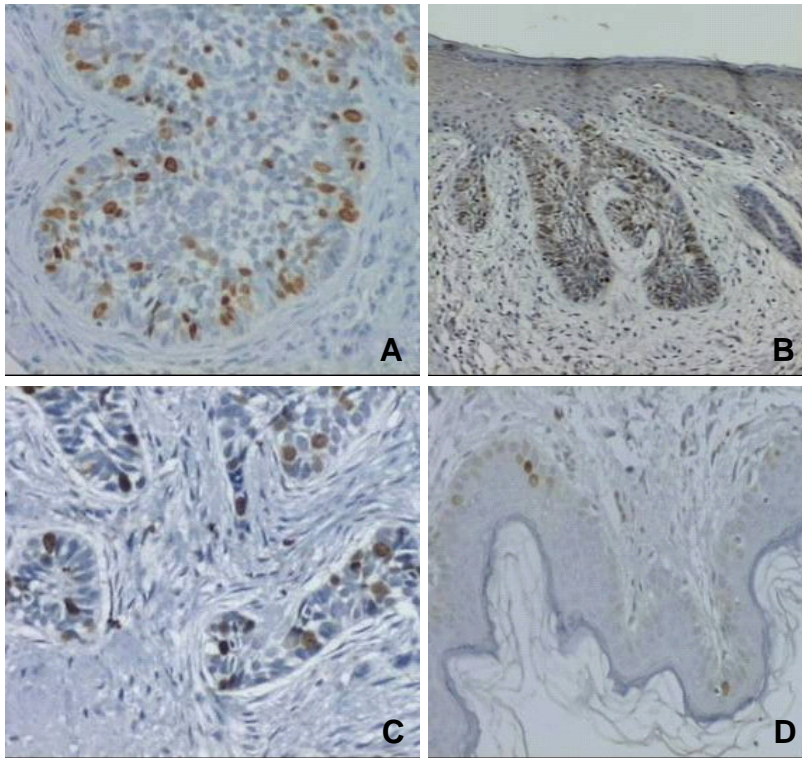


FIGURA 9

- A) Expressão quase nula do Ki-67 em CBC nodular (200X).
- B) Ausência de expressão do Ki-67 em CBC superficial (100X).
- C) Pequena expressão do Ki-67 em CBC morfeiforme (100X).
- D) Ausência de marcação do Ki-67 em tecido palpebral superior (200X).

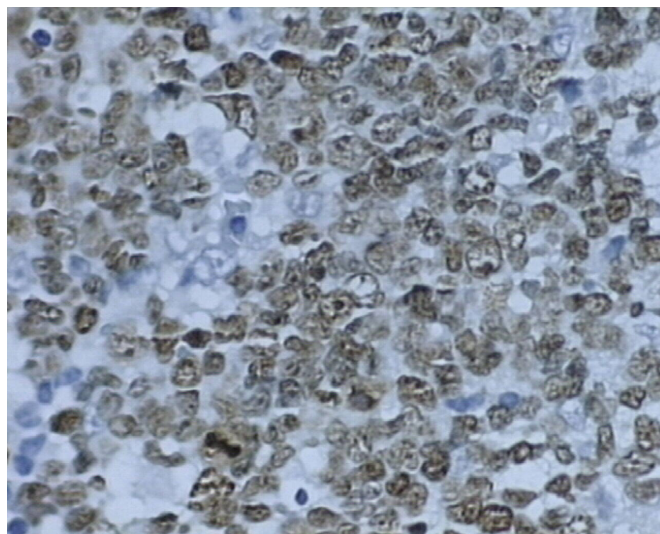


FIGURA 10: Controle positivo do Ki-67 em lâmina de tonsila palatina (400X)

5.2.4- Bcl-2

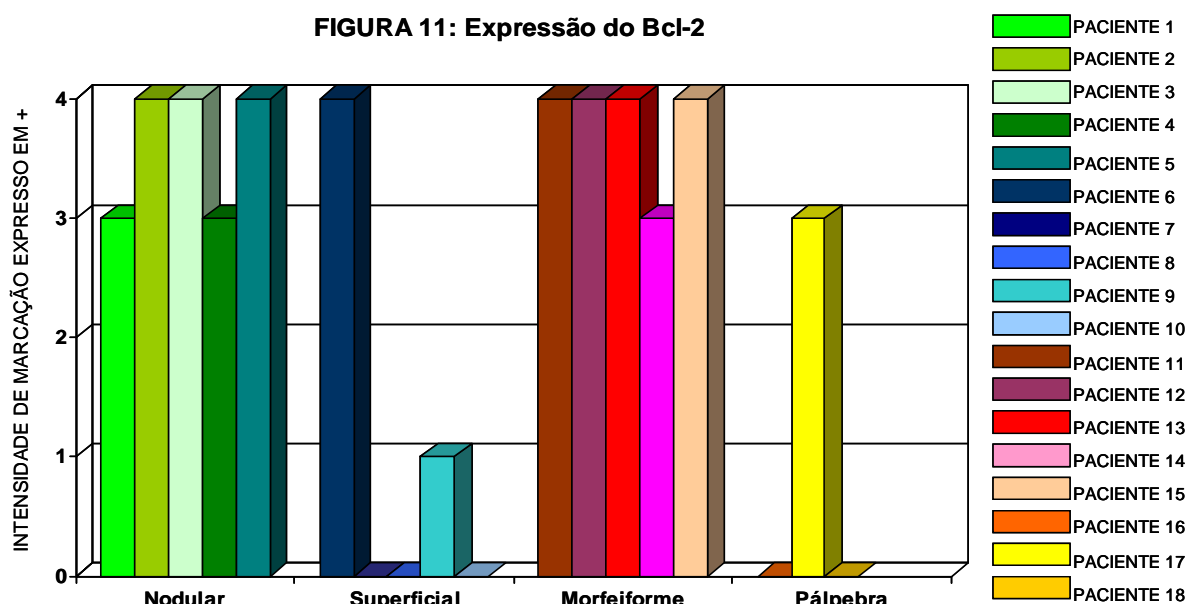
O Bcl-2 mostrou uma imunomarcção citoplasmática, de aspecto granular, de coloração acastanhada, além de uma marcação linear a nível de membrana celular externa na grande maioria das células do bloco tumoral, também acastanhada, porém mais escura, contrastando com a coloração do citoplasma celular.

A marcação do Bcl-2 foi bastante expressiva (Fig. 11), sendo 4+ em 80% dos morfeiforme e 2+ em apenas 20% desta variante (Fig. 12 A). No tipo nodular, 60% das amostras expressaram 4+ e 40%, 3+ (Fig. 12 B).

No CBC superficial, a expressão foi pequena, sendo ausente em 60% das amostras; e 20% com expressão de 3+ e outros tantos 20% expressaram 2+ (Fig. 12 C).

Nas pálpebras, houve uma marcação em 3+ em apenas uma amostra, sendo as outras duas negativas. No caso em que houve marcação, esta ocorreu apenas nas células da camada basal da epiderme (Fig. 12 D).

Como controle positivo, também aqui, conforme preconizado pelo laboratório, foram utilizadas lâminas contendo cortes de tonsilas palatinas (Fig. 13).



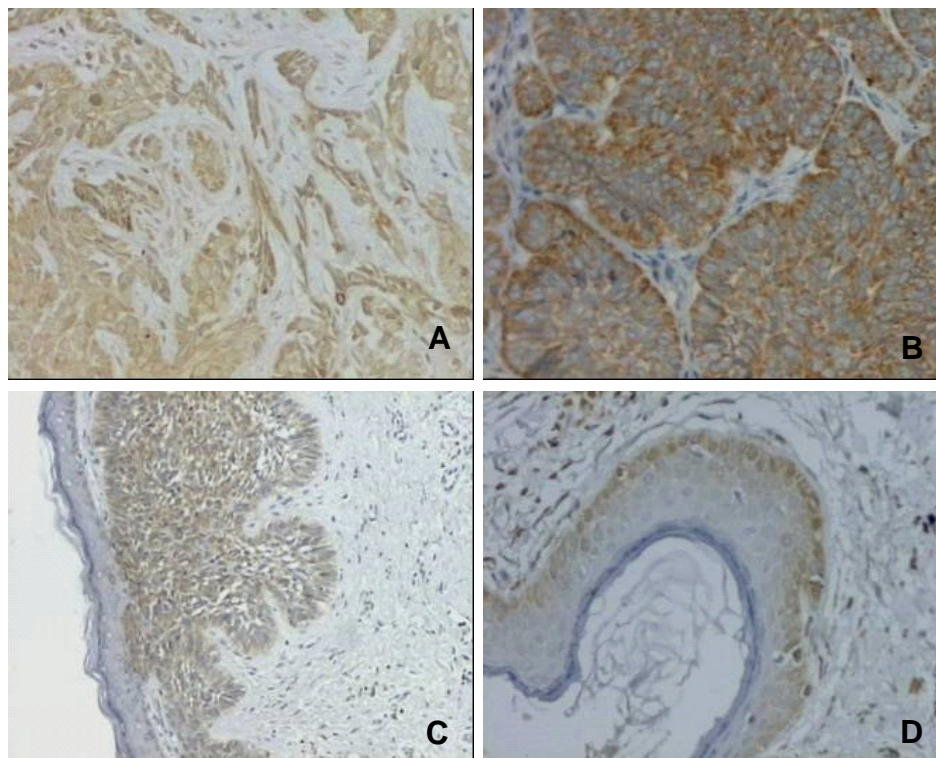


FIGURA 12

A) Expressão em 4+ do Bcl-2 em CBC morfeiforme (200X).

B) Expressão em 4+ do Bcl-2 em CBC nodular (200X).

C) Expressão em 3+ do Bcl-2 em CBC superficial (100X).

D) Expressão em 3+ do Bcl-2 em células da camada basal do tecido palpebral (200X).

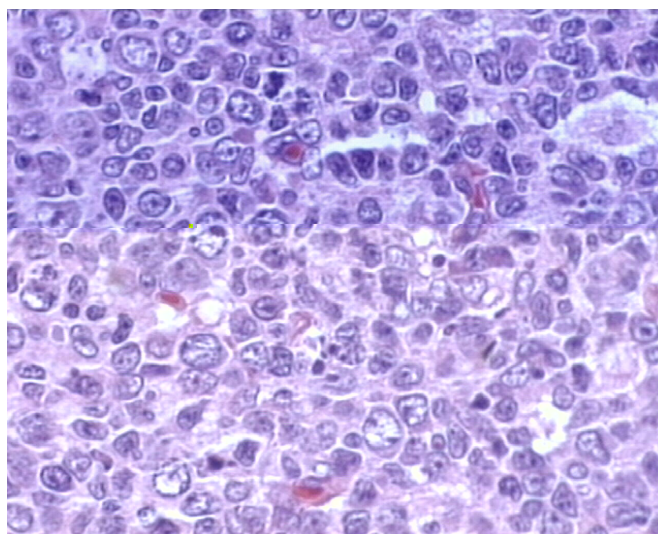


FIGURA 13: Controle positivo do Bcl-2. Corte de tonsila palatina (400X)

5.3- Resultado Estatístico

Como já foi mencionado no capítulo que aborda a metodologia, para interpretação dos dados, foi usado o teste não paramétrico de Mann Whitney, com amostras independentes, verificando a significância dos resultados ($p < 0,05$). Observamos uma forte tendência para indicar a gravidade do tumor, usando os marcadores Bcl-2 ($p = 0,04$) e Ki-67 ($p = 0,04$), conforme a Tabela 2.

Com relação ao p-53, verificou-se um $p = 0,02$ no CBC do tipo superficial, ou seja, uma alta significância em um tumor de baixa malignidade.

Tabela 2: Valores de p (significância) resultados do teste de Mann-Whitney para comparação dos marcadores entre os tipos de tumores e o grupo de controle.

Tipo	p53	PCNA	Ki-67	Bcl-2
Morfeiforme	8,5%	100,0%	4,0%	4,0%
Nodular	7,2%	100,0%	11,2%	11,2%
Superficial	2,0%	43,9%	23,7%	23,7%

6- DISCUSSÃO

Em nosso estudo, comparamos a expressão dos marcadores Bcl-2, p-53, KI-67 e PCNA em indivíduos portadores de CBC do tipo morfeiforme, nodular e superficial, com controles negativos representados por pele palpebral superior, livre de tumor.

A marcação do Bcl-2 foi altamente expressiva nos CBCs ditos agressivos. A variante morfeiforme foi a que mais expressou o Bcl-2, seguida pela nodular, o que vem confirmar dados da bibliografia.

Rodrigues-Villanueva *et al*, em 1995, afirmavam que o CBC, sem exceção, expressou moderados ou altos níveis da proteína Bcl-2, sendo que as variantes clínicas mais agressivas, como a morfeiforme, mostraram uma imunorreatividade para o Bcl-2 maior que a variante nodular (CAZAL *et al*, 2006).

Uma significativa correlação negativa entre a expressão do p-53 e ou Bcl-2 com o desenvolvimento do CBC tem sido descrita. Mutações do p-53, ou a superexpressão do Bcl-2, é suficiente para aumentar a formação do CBC por supressão da apoptose (CROWSON, 2006; TILLY *et al*, 2006).

Embora, na maioria dos estudos, a expressão da Bcl-2 esteja relacionada com a gravidade do tumor, Lear; Dahlke; Murray (2007) em um trabalho de revisão, afirmam que o “gen da sobrevivência da apoptose”(Bcl-2) está aumentado nos CBCs nodular e superficial, que foram os tumores avaliados.

O p-53 está freqüentemente alterado nos tumores humanos, incluindo o câncer de pele, em que tais mutações foram mostradas como resultado da exposição solar (GAITONDE e RONAI, 2007). Alterações do p-53 são encontradas em 50% dos casos de CBC, porém é difícil discernir se este defeito do gen supressor de tumor mais conhecido (*p-53*) é a causa do desenvolvimento do CBC ou se é meramente um marcador de danos causados pela luz ultravioleta (LEAR; DAHLKE; MURRAY, 2007). Porém, Tilly *et al* (2005) já haviam afirmado que a síntese ou a estabilização do p-53 é essencial para induzir à apoptose no CBC.

Dos tumores que estudamos, 66,7% (dez) expressaram fortemente o p-53 e, no grupo controle, apenas um individuo expressou fracamente este marcador, somente em células da camada basal, confirmando as afirmações de Hokim *et al* (2006) e Ansarin; Daliri; Soltani-Arabshahi (2006).

As mutações da proteína p53 são comuns em algumas neoplasias malignas, sendo a sua detecção imunoistoquímica reflexo da alteração gênica, já que a p53 normal, por ter meia-

vida curta e baixos níveis, não é facilmente detectada. Porém, nem todos os tumores positivos para a p53 exibem mutações gênicas e a ausência de marcação imunoistoquímica não significa ausência de envolvimento gênico. A avaliação imunoistoquímica da proteína p53 necessita de interpretação criteriosa, pois resultados falsos positivos e falsos negativos podem acontecer. Estes resultados inconsistentes podem ser atribuídos, principalmente, à complexa biologia da proteína (QUEIROZ, 1997).

Com os nossos resultados, apesar de estarem de acordo com alguns autores, podemos apenas sugerir que, no CBC do tipo superficial, parece existir um alto percentual de mutação desta proteína. Porém, grande número de tumores precisa ser avaliado, para que só assim se estabeleça a correlação clínica desta proteína com o CBC.

A expressão do Ki-67 nos fornece somente a informação de a célula estar ou não no ciclo celular, mas nada sobre a duração do seu ciclo celular. Como este marcador reflete apenas o momento da vida da célula, é possível que determinada neoplasia apresente alta taxa de proliferação e um baixo percentual de células positivas. Alguns trabalhos mostram que o Ki-67 não sofre tantas influências de fatores internos e externos, como o PCNA, sendo, por isso, superior como marcador de proliferação celular (ARISAWA *et al*, 1999).

Nossos resultados mostram uma maior expressão do Ki-67 no CBC nodular e superficial, sendo que, neste último, a marcação em 4+ ocorreu em apenas 40% (dois) dos casos. Nos controles, não aconteceu qualquer marcação. Portanto, com estes resultados, não podemos afirmar, como na literatura, que o Ki-67 é um marcador que auxilia no diagnóstico e na gravidade do CBC (ANSARIN; DALIRI; SOLTANI-ARABSHAHI, 2006; ARISAWA *et al*, 1999), devido à grande variação da sua expressão celular.

O alto índice de positividade do PCNA encontrado nos tumores aqui estudados também foi descrito por outros autores (ARISAWA *et al*, 1999; RODRIGUES-VILLANUEVA *et al*, 1995) e foi considerado causa de baixa sensibilidade para pesquisar índice de proliferação, quando comparado com outros marcadores.

Sem conhecer o exato momento do ciclo celular, não é possível determinar se o elevado número de células PCNA positivas em uma neoplasia é fruto do alto *turnover* ou se indica uma grande proporção de células dividindo-se em prolongado ciclo celular.

Existe uma variação na intensidade de coloração das células PCNA positivas que pode ser atribuída a sua longa meia-vida. Devido à impossibilidade de se saber se a célula com coloração menos intensa está ciclando ou não, é sugerido que se considerem todas as células marcadas, independente da intensidade da coloração (AGUIAR, 1996; ARISAWA *et al*,

1999), exatamente como foi o nosso procedimento para avaliar as células marcadas pelo PCNA.

A utilidade e a confiabilidade destes biomarcadores estão diretamente ligadas a sua melhor caracterização, com um maior número de estudos que correlacione a detecção destes marcadores aos dados clínicos e a outros métodos de avaliação da proliferação, já padronizados, como a análise através da morfometria.

No momento, parece que ainda não temos um teste que seja totalmente confiável e conclusivo. Porém, os diversos marcadores analisados neste trabalho podem nos auxiliar na análise sobre a gravidade dos três subtipos de CBC aqui estudados.

7- CONCLUSÕES

De acordo com os resultados imunoistoquímicos da expressão do p53, PCNA, Ki-67 e Bcl-2, nas variantes morfeiforme, nodular e superficial do Carcinoma basocelular e na pele palpebral de pacientes livres da patologia, pode-se concluir que:

- O Bcl-2 e a proteína p-53 apresentam uma tendência para diagnóstico de gravidade do Carcinoma basocelular, sendo que a p-53 se expressa mais fortemente nos casos menos invasivos.
- O Ki-67 tem um comportamento variável, nos tipos de CBC estudados, não podendo ser considerado como indicador de prognóstico.
- A avaliação da proliferação celular pelo PCNA não permite diferenciar o prognóstico dos tipos morfeiforme, nodular e superficial do CBC e nem mesmo da pele palpebral de pacientes livres da doença.

8- PERSPECTIVAS FUTURAS

Tendo em vista os resultados aqui alcançados, será dada continuidade ao estudo com aumento do número de pacientes (n), estudo morfométrico detalhado das células reagentes aos marcadores e estudo dos linfócitos no sangue periférico, de portadores de CBC, através da Citometria de fluxo.

ANEXO I

<i>Paciente</i>	<i>Nome</i>	<i>S</i>	<i>Idade</i>	<i>Localização</i>	<i>Tamanho</i>	<i>Variante</i>	<i>p-53</i>	<i>PCNA</i>	<i>Ki-67</i>	<i>Bcl-2</i>
1	WJS	M	49	Pálpebra inf. E.	0,8 X 0,7 X 0,2	Nod	4+	4+	4+	3+
2	PMM	F	93	Orelha direita	0,8 X 0,6 X 0,3	Nod	4+	4+	0	4+
3	SZC	F	51	Asa nasal D.	0,9 X 0,8 X 0,4	Nod	4+	4+	4+	4+
4	JGF	M	88	Dorso nasal D.	0,5 X 0,3 X 0,2	Nod	0	4+	0	3+
5	EAE	F	51	Dorso Nasal	0,8 X 0,6 X 0,2	Nod	4+	4+	4+	4+
6	IT	F	62	Tórax superior	1,5 X 0,8 X 0,5	Superf	4+	4+	0	4+
7	JMSM	M	64	Orelha direita	0,6 X 0,4 X 0,2	Superf	4+	4+	0	0
8	CFAM	F	84	Dorso Nasal	0,6 X 0,3 X 0,4	Superf	2+	2+	0	0
9	DDK	M	53	Ombro E	1 X 0,9 X 0,5	Superf	4+	4+	4+	1+
10	VCAL	F	66	Face	0,7 X 0,2 X 0,3	Superf	2+	4+	4+	0
11	JOO	M	90	Orelha E.	0,8 X 0,6 X 0,2	Morfeif	4+	4+	3+	4+
12	RMB	M	70	Orelha E.	1 X 0,8 X 0,4	Morfeif	2+	4+	3+	4+
13	GCF	M	59	Asa nasal D.	1 X 0,8 X 0,6	Morfeif	4+	4+	3+	4+
14	RJA	M	60	Frontal D	0,8 X 0,8 X 0,2	Morfeif	0	4+	0	3+
15	JCF	F	65	Ponta nasal	0,9 X 0,8 X 0,4	Morfeif	4+	4+	3+	4+
16	MHBS	F		Pálpebra	4 X 2	Pálpebra	0	4+	0	0
17	ICB S	F	57	Pálpebra	4 X 8	Pálpebra	0	4+	0	3+
18	FAAA	F	43	Pálpebra	4 X 1	Pálpebra	1+	4+	0	0

REFERÊNCIAS

AGUIAR, M.C.F. **Estudo Comparativo das Proteínas p53, PCNA, Ki-67 das regiões organizadoras nucleolares (NORs) no epitélio de revestimento da mucosa próximo ao carcinoma epidermóide da boca.** 1996. Tese (Doutorado) - Fac. Odont. USP, São Paulo.

ALBERTS, B. *et al.* **Molecular Biology of the Cell**; 3 ed. New York: Garland Publishing, 1294, 1994.

ANSARIN, H.; DALIRI, M.; SOLTANI-ARABSHAHI, R. Expression of p53 in aggressive and non-aggressive histologic variants of basal cell carcinoma. **Eur J. Dermatol.** V. 16, n. 5, 543-547, 2006.

ARISAWA, E.A.L. *et al.* Marcadores biológicos: PCNA e Ki-67 breve revisão. **Rev. Fac. Odont. São José dos Campos**, v.2, n.1, jan-jun, 1999.

BANDEIRA, A.M. *et al.* Carcinomas basocelulares: estudo clínico e anatomopatológico de 704 tumores. **Anais Brasileiro de Dermatologia.**, v.178, n. 1, Rio de Janeiro, jan-fev, 2003.

BATINAC, T. *et al.* P53 Protein Expression and Cell Proliferation in Non-Neoplastic and Neoplastic Proliferative Skin Diseases. **Tumori**, 90, 120-127, 2004.

BORTOLUCCI DA SILVA, F.; GALVÃO DE SOUZA, S.M. Aplicação da Biologia Molecular na Odontologia: Conceitos e Técnicas. **Rev. Fac. Odont de Lins / Unimep.** V14, n.2, 7-14, jul-dez, 2002.

BROWN, D.C.; GATTER, K.C. Monoclonal antibody ki-67: its use in histopathology. **Histopathology**, v.17, 486-503, 1990.

BUETTNER, L.A., RAASCH, B.A. Incidence rates of skin cancer in Townsville, Australia. **Internacional Journal of Cancer**, v.78, n.5, 587-593, 1998.

CAMPBELL, C.C. *et al.* p53 mutations are common and early events that precede tumor invasion in squamous cell neoplasia of the skin. **Journal of Investigative Dermatology**, v.100, n.6, 746-748, jun 1993

CAVALCANTI JR, G.B. *et al.* Citometria de Fluxo, Imunocitoquímica e Western Blot na Detecção da Expressão da Proteína p53 em Células Tumerais: uma Análise Comparativa. **Revista Brasileira de Análises Clínicas.** V.35 (3), 135-142, 2003.

CAZAL, C. *et al.* Aumento da Expressão bcl-2 em Carcinoma Basocelular Agressivo da Região de Cabeça e Pescoço. **Pesquisa Bras. Odontopediatria Clin. Integr.** V. 6, n. 3, 267-272, 2006.

CEBALLOS, E.H.; ACOSTA, E. Carcinoma basocelular: concepto e historia. In: **Monografias de Dermatologia**. 2003. Disponível em http://www.grupoaulamedica.com/web/archivos_rojo/revistas_actual.cfm?idRevista=155. Acesso em 24/out/2005.

CROWSON, A.N. Basal cell carcinoma: biology, morphology and clinical implications. **Modern Pathology**, v.19, S127-S147, 2006.

DANIEL P. T. Dissecting the pathways to death. **Leukemia**. v14, 2035-2044, 2000.

DIXON A.Y.; LEE S.H.; MCGREGOR D.H. Factors predictive of recurrence of basal cell carcinoma. **Am J Dermatopathol**, v.11,n.3,222-232, 1989.

ELDER, D.E. *et al.* **Lever's Histopathology of the Skin**. Ninth ed., 836-849, 2005.

FARIA, J.R. **Estudo da Expressão de proteínas pró-apoptóticas e anti-apoptóticas antes e após cultura com fludarabina em células de leucemia linfocítica crônica**. 2002. Tese (Doutorado) - Escola Paulista de Medicina, USP, São Paulo.

FARMER, E.R.; HOOD, A. F. **Pathology of the Skin**. Second ed., 970-982, 2000, McGraw-Hill.

FIELD, J.K. *et al.* The role of the p53 tumor suppressor gene in squamous cell carcinoma of the head and neck. **Arch Otolaryngol. Head Neck Surg.**, v.119, 1118-1122, 1993.

FREEDBERG, I.; EINSEN, A. **Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine**. 6 ed, 2003, Macgraw-Hill

GAITONDE, S.; RONAI, Z. A darker side to p53. **Pigment Cell Res.** v. 20, 148-149, 2007.

GAMONAL, A. **Dermatologia Elementar**, 2ª ed, 269-270, 2002, ed pelo autor.

GERDES, J. *et al.* Immunohistological Detection of Tumour Growth Fraction (Ki-67 antigen) in Formalin-fixed and routinely processed tissues. **Journal of Pathology**, v.168, 85-87, 1992.

HABIF, T.P. **Dermatologia Clínica – Guia Colorido para Diagnóstico e Tratamento.** 24 ed, 21:738-749, 2005, Artmed.

HARRISON, R.F.; REYNOLDS, G.M.; ROWLANDS, D.C. Immunohistochemical evidence for the expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) by non-proliferating hipatocytes adjacent to metastatic tumors and in inflamatory condictions. **Journal of Pathology**, v. 171, 115-122, 1993.

HELANDER, S.D; PETERS, M.S.; PITTELKOW, M.R. Expression of p53 protein in benign and malignant epidermal pathologic condictions. **Journal of the American Academy of Dermatology**; v.29; n.5, part1, 741-748, 1993.

HO KIM, K. *et al.* Immunohistochemical study of cyclooxygenase-2 and p53 expression in skin tumors. **Journal of Dermatology**. V.33,319-325, 2006

HUANG, W.Y-F *et al.* Histopathologic evaluation of proliferating cell nuclear antigen (PC10) in oral epithelial hyperplasias and premalignant lesion. **Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol**, v.78, 748-754, 1994.

HUANG, Z. Bcl-2 family proteins as targets for anticancer drug design. **Oncogenese**, v.19, 6627-6631, 2000.

HWA JEE, S. *et al.* Curcumin Induces a p53-dependent apoptosis in Human Basal cell carcinoma cells. **Journal of Investigative Dermatology**. V.111, n.4, 656-661, out., 1998

INCA. **Câncer de Pele não Melanoma**. Disponível em www.inca.gov.br/conteudo.asp?id=334. Acesso em 24/out/2005.

ISHI, L.A. *et al.* Basal cell carcinoma of the eyelid: factores related to recurrence. **Anais Brasileiros de Dermatologia**,v.79, n.4, 423-430, 2004

ISOHERRANEN, K. *et al.* UV irradiation induces downregulation of bcl-2 expression in vitro and in vivo. **Arch Dermatol.**, v. 291, 212-216, 1999.

JACOBS G. H. *et al.* Prediction of aggressive behavior in basal cell carcinoma. **Cancer**, v. 49,n.3, 533-537, 1982.

KERSCHUMANN, R. L.; MCCALMONT, T. H.; LEBOIT, P.E. p53 oncoprotein expression and proliferation index in keratoacantoma and squamous cell carcinoma. **Arch. Dermatol.**; v.130, 181-186, 1994.

KOPKE, L. F. F; SCHMIDT, M. Carcinoma Basocelular. **Anais Brasileiro de Dermatologia.**, v.77, n.2, p. 249-285, Rio de Janeiro, mar-abr, 2002.

KOPLIN L.; ZAREN H.A. Recurrent basal cell carcinoma: a review concerning the incidence, behavior, and management of recurrent basal cell carcinoma, with emphasis on the incompletely excised lesion. **Plast Reconstru Surg.**, v.65, 656-63, 1980.

KUBBUTAT, M.H.G. *et al.* Epitope analysis of antibodies recognising the cell proliferation associated nuclear antigen previously defined by the antibody ki-67 (ki-67 protein). **J. Clin. Pathol.** V.47, 524-528, 1994.

KUMAR, V; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N. **Robbins e Cotran – Patologia: Bases patológicas das Doenças.** 7ª ed, 27-33 e 1299-1303, 2005, Elsevier.

KURSKI, P. *et al.* Expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA)/Cyclin during the cell cycle. **Experimental Cell Research**, v.166, 209-219, 1986.

LAGE, I.R. *et al.* Epidemiología Del Cáncer de Piel no Melanoma (hospital Provincial de Villa Clara). **Rev Cubana Oncologia**, v. 17, n.1, p.43-47, 2001.

LEAR, W.; DAHLKE, E.; MURRAY, C.A. Basal Cell Carcinoma: Review of Epidemiology, Pathogenesis, and Associated Risk Factors. **Journal of Cutaneous Medicine and Surgery**, v. 11, n.1, 19-30, 2007.

LEVINE, A.J. *et al.* The 1993 Walter Hubert Lecture: the role of the p53 tumour-suppressor gene in tumorigenesis. **Br. J. Cancer**, v. 69, 409-416, 1994.

LEVINE H.L.; BAILIN P.L. Basal cell carcinoma of the head and neck: identification of the risk patient. **Laryngoscope**, v.90, 955-61, 1980.

LI, T.J.; BROWNE, R.M.; MATTHEWS, J.B. Expression of proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) and Ki-67 in Unicystic Ameloblastoma. **Histopathology**, v.26, 219-228, 1995.

LIN, Z. *et al.* The expressiona of bcl-2 and bcl-6 protein in normal and malignant transition epithelium. **Urol. Rev.**, v.31, 272-275, jul. 2003.

LIU, Y-J, *et al.* Germinal center cells express bcl-2 protein after activation by signals which prevent their entry into apoptosis. **European Journal Immunology**, v.21, 1905-1910, 1991.

McCARTHY, J.G. **Plastic Surgery**, v.5, 3599-3604, 1990, W.B. Saunders Company.

MCKEE, P.H.; CALONJE, E.; GRANTER, S.R. **Pathology of the Skin – With Clinical Correlation.** Third ed., 2:1167-1182, 2005, Elsevier.

MELEGA, J. M. **Cirurgia Plástica – Fundamentos e Arte**, v.1, 349-357, 2002, Medsi.

MIYACHI, K; FRITZLER, M. J.; TAN, E. M. Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells. **J. Immunol**, v. 121, n. 6, p. 2228-2234, dec. 1978.

MORALES-DUCRET, C.R.J. *et al.* Bcl-2 expression in primary malignancies of the skin. **Arch Dermatol.**,v.131, 909-912, agosto, 1995.

MURPHY, M. *et al.* Comparison of the expression of p53, p21, bax and the induction of apoptosis between patients with basal cell carcinoma and normal controls in response to ultraviolet irradiation. **J. Clin. Pathology**. n.55, 829-833, 2002.

NAGANO, T.; UEDA, M.; ICHIHASHI, M. Expression of p53 protein is a early event in ultraviolet light-induced cutaneous squamous cell carcinogenesis. **Arch. Dermatol.** V. 129, 1157-1161, set 1993.

NASSER, N. Epidemiologia dos Carcinomas Basocelulares em Blumenau, SC, Brasil, de 1980 a 1999. **Anais Brasileiro de Dermatologia.**, v. 80, n.4, Rio de Janeiro, jul-ago, 2005.

O’GORMAN, D. M.; COTTER, T. G. Molecular signals in anti-apoptotic survival pathways. **Leukemia**, v. 15; n. 1; 21-34; 2001.

PARK, H.R. *et al.* Expression profiles of p63, p53, survivin an htert in skin tumors. **Journal of Cutaneous Pathology**. v.31, 544-549, 2004.

PRAXEDES, C. E. S. Artigo de Patologia bucal. Disponível em <http://www.odontologia.com.br/artigos.asp?id=350&idesp=5&ler=s>. Acesso 22/out/2005.

QUEIROZ, L. M. G. **Expressão do PCNA, Ki-67, c-erbB-2 e p53 no carcinoma adenóide cístico e adenocarcinoma polimórfico de baixo grau de malignidade de glândula salivar menor.** 1997. Tese (Doutorado) - Fac odont USP, São Paulo.

RABENHORST, S. H.; BURINI, R.C.; SCHMITT, F. C. L. Marcadores da Proliferação Celular. **Rev. Bras. Pat. Clin.**, v.29, n.1, 24-29, 1993.

RABENHORST, S. H.; BURINI, R. C.; SCHMITT, F. C. L. Ciclo Celular: Mecanismos Reguladores e Marcadores Bioquímicos. **Rev. Bras. Cancerol.** V.40, n. 3, 141-147, 1994.

RODRIGUEZ-VILLANUEVA, J. *et al.* The expression and localization of Bcl-2 protein in normal skin and in non-melanoma skin cancers. **Path. Res Pract.**, v. 191, 391-398, 1995.

ROSE, D. S. C.; MARDOX, P. H.; BROWN, D.C. Which proliferation markers for routine immunohistology ? A comparasion of five antibodies. **Journal Clin Pathol**, v. 47, 1010-1014, 1994.

RUBIN, A.I.; CHEN, E.H; RATNER, D. Basal-cell carcinoma-current concepts. **New England Journal of Medicine**. V. 353, n.21, 2262-2269, 24 nov 2005.

SHIN, D.M. *et al.* Sequential increases in Proliferating Cell Nuclear antigen expression in head and neck tumorigenesis: a potential biomarker. **Journal of the National Cancer Institute**, v.85, n.12, 197-978, 16/jun/1993.

SKALOVA, A. *et al.* Cell proliferation correlates with prognosis in acinic cell carcinomas of salivary gland origin. Immunohistochemical study of 30 cases using the MID 1 antibody in formalin-fixed paraffin sections. **Journal of Pathology**, v.173, 13-21, 1994.

SOUZA, F.A.C. *et al.* Alterações gênicas e câncer bucal – uma breve revisão. **Rev. Bras. de Patologia Oral**, v. 3, n. 1, 20-25, 2004.

STRATIGOS, A. J. *et al.* Immunophenotupic Analysis of the p53 Gene in Non-Melanoma Skin Cancer and Correlation With Apoptosis and Cell Proliferation. **Journal European Academy of Dermatology and Venereology**. V.19, p. 180-186, 2005.

SWANSON, N.A; GREKIN, R. C.; BAKER, S. R. Mohs surgery techniques indications, and applications in head and neck surgery. **Head and Neck Surg**. V.6, n.2, p. 683-692, 1983.

TILLI, C.M.L.J *et al.* Molecular aetiology and pathogenesis of basal cell carcinoma. **British Journal of Dermatology**, v. 152, p. 1108-1124, 2005.

TOTH, D. P.; GUENTHER, L.C.; SHUM, D.T. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA); prognostic value in the clinical recurrence of primary basal cell carcinoma. **Journal of Dermatological Science**, v.11, 36-40, 1996.

TWEDDLE, D.A. *et al.* P53 cellular localization and function in neuroblastoma. **American Journal of Pathology**. V.158, n.6, 2067-2077, junho, 2001.

VERHAEGH, M.E.J.M *et al.* Expression of the apoptosis-supressing protein Bcl-2 in non-melanoma skin cancer. **British Journal of Dermatology**, v.132, 740-744, 1995.

WIKONKAL, N.M. *et al.* Bcl-2 vs p53 protein expression and apoptotic rate human nonmelanoma skin cancers. **Arch. Dermatol.**, v.133, 599-602. maio, 1997.