

Expressão de marcadores de proliferação celular e apoptose em carcinoma basocelular*

Markers expression of cell proliferation and apoptosis in basal cell carcinoma

Marília de Pádua Dornelas Corrêa¹

Ângela Maria Gollner³

Magno Cunha de Souza Guerra⁵

Ana Paula Ferreira²

Michele Fernandes Rodrigues⁴

Resumo: FUNDAMENTOS: O carcinoma basocelular é o câncer mais comum em humanos. Estudos que utilizam recursos da biologia molecular e genética, associados à histomorfologia, permitem a identificação de fatores de risco no desenvolvimento de lesões mais recorrentes e agressivas.

OBJETIVO: 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.

MÉTODOS: Estudaram-se cinco amostras das formas nodular, morfeiforme e superficial, respectivamente, e um grupo-controle com três pacientes livres de lesão. Empregou-se o teste de Mann-Whitney na comparação da expressão desses marcadores com a forma de apresentação do carcinoma basocelular.

RESULTADOS: Verificou-se que a marcação do Bcl-2 foi expressiva nos CBCs ditos agressivos (variantes morfeiforme e nodular). Dos tumores estudados, 66,7% (n = 10) indicaram fortemente o p53. Nossos resultados mostram maior expressão do Ki-67 no carcinoma basocelular nodular e superficial, sem expressão nos controles. O PCNA mostrou forte marcação em todos os tipos de tumores e nos controles.

CONCLUSÃO: Os achados nos permitem concluir que o Bcl-2 e o p53 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; imunoistoquímica; marcadores biológicos de tumor; neoplasias cutâneas; proteínas de ciclo celular

Abstract: BACKGROUND: - Basal cell carcinoma is the most common form of human cancer. Studies employing molecular and genetic biology techniques, associated with histomorphology, lead to the identification of risk factors in the development of more recurring and aggressive lesions.

OBJECTIVE - To correlate markers expression of apoptosis (p53 and bcl-2) and cell proliferation (Ki-67 and PCNA) with histological indicators of tumor severity.

METHODS - Five samples of the nodular, morpheaform and superficial types of carcinoma were studied, respectively. One control group with three lesion-free patients was also included in the study. The Mann-Whitney test was used to compare these markers expression with the manifestation form of basal cell carcinoma.

RESULTS - Bcl-2 expression was significant in basal cell carcinomas said to be aggressive (morpheaform and nodular types). Of the studied tumors, 66.7% (n = 10) strongly expressed p53. Our results show a greater expression of Ki-67 in nodular and superficial basal cell carcinoma, with no expression in the controls. PCNA showed a strong expression in all types of tumors and in the controls.

CONCLUSION - The findings allow us to conclude that Bcl-2 and p53 show a tendency to indicate the severity of basal cell carcinoma. In contrast, Ki-67, due to its variable behavior, cannot be considered a marker of severity. Also, PCNA was not a good marker of cell proliferation.

Keywords: carcinoma, basal cell; cell cycle proteins; immunohistochemistry; skin neoplasms; tumor markers; biological

Recebido em 10.06.2009.

Aprovado pelo Conselho Consultivo e aceito para publicação em 21.07.09.

* Trabalho realizado no Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) e no Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) – Juiz de Fora (MG), Brasil.

Manuscrito baseado em dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Brasileira da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) – Juiz de Fora (MG), Brasil, 2008.

Conflito de interesse: Nenhum / Conflict of interest: None

Suporte financeiro: Nenhum / Financial funding: None

¹ Professora adjunta do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) – Juiz de Fora (MG), Brasil.

² Doutora em Imunologia pela Universidade de São Paulo (USP), Professora associada do Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) – Juiz de Fora (MG), Brasil.

³ Doutora em Patologia pela Universidade Federal Fluminense (UFF) – Rio de Janeiro (RJ), Brasil, Professora adjunta do Departamento de Patologia da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) – Juiz de Fora (MG), Brasil.

⁴ Mestranda do Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), na área de Imunologia – Juiz de Fora (MG), Brasil.

⁵ Acadêmico do 6º ano do Curso de Medicina da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) – Juiz de Fora (MG), Brasil.

INTRODUÇÃO

O carcinoma basocelular (CBC) é o tipo de câncer mais comum em humanos, acometendo, principalmente, homens maiores de 50 anos de idade, com pele tipo I. Localiza-se, preferencialmente, em cabeça (terço superior da face) e pescoço.¹

Manifesta-se como pápula ou nódulo, infiltrativo, da cor da pele, eritematoso ou de coloração acastanhada, com telangiectasias e aspecto perolado. As diferentes formas clínicas variam em aspecto e potencial maligno, sendo as mais frequentes: nodular ou noduloulcerativa, superficial ou pagetoide, esclerodermiforme ou morfeiforme, cístico e pigmentado.²

Geralmente, o CBC apresenta crescimento lento e baixa agressividade e raramente apresenta metástase, sendo efetivamente tratado pelas diversas opções terapêuticas. Contudo, uma minoria de casos tem comportamento biológico agressivo, causando extensa destruição tissular e, até mesmo, metástases. Nesses pacientes, o tratamento pode causar deformidades funcionais e estéticas, gerando elevados custos ao sistema de saúde.³

Com o aumento na incidência de CBC, pesquisas na histogênese dessa neoplasia com recursos da biologia molecular e genética, associadas às avaliações histomorfológicas e inquéritos epidemiológicos, têm permitido determinar parâmetros com significado prognóstico.⁴ Com isso, tenta-se nortear a identificação de fatores de risco para o desenvolvimento de lesões mais agressivas, com maior potencial de recidiva e metástases.⁵

A complementação do estudo histológico e morfológico do CBC com marcadores biológicos de proliferação celular e apoptose, mediante a técnica de imunistoquímica (IHQ), permite a compreensão de alterações morfofuncionais no processo de transformação neoplásica e a identificação precoce de malignização.⁶ Informações sobre o comportamento biológico das neoplasias podem auxiliar na prevenção e na definição do tipo de tratamento a ser instituído, permitindo o desenvolvimento de novas drogas, dirigidas especificamente a moléculas celulares facilitadoras da propagação tumoral.⁷

A proliferação celular e a morte celular programada (apoptose) são consideradas importantes eventos na carcinogênese. Sabe-se que a luz ultravioleta causa danos no DNA da epiderme que podem ser reparados ou eliminados por meio de apoptose, prevenindo-se, assim, o desenvolvimento do câncer.⁸ Alterações nos genes controladores do mecanismo de apoptose (p53 e Bcl-2) e nos marcadores de proliferação celular (Ki-67 e PCNA) estão associadas à predisposição dos indivíduos ao câncer.⁹

A transcrição do gene p53 resulta em uma fosfo-proteína nuclear que induz à apoptose celular, quando ocorre falha de um mecanismo reparador de danos ao DNA, impedindo a proliferação de células mutantes. As

mutações em p53 podem indicar malignização de determinada lesão.¹⁰ Outro gene considerado “chave reguladora da apoptose” é o Bcl-2, codificador de uma proteína que inibe a apoptose. Sua expressão anormal pode levar à “imortalização” da célula, predispondo-a ao desenvolvimento de neoplasias.¹¹

Existem dois marcadores de proliferação celular importantes na avaliação do CBC: o antígeno nuclear de células proliferativas (PCNA) e o Ki-67. O PCNA foi considerado, em estudos prévios, como boa alternativa para a identificação de compartimentos de proliferação celular dentro de amostras tumorais emblocadas.¹² A expressão de PCNA encontra-se aumentada na carcinogênese cutânea relacionada à luz ultravioleta.¹³ Já a análise imunistoquímica do Ki-67, produto de uma sequência gênica, foi considerada, em pesquisa recente, um método eficaz para a avaliação da fração de crescimento das neoplasias humanas, fornecendo informação prognóstica valiosa sobre a doença.¹⁴

Considerando-se a possibilidade de determinar o potencial de agressividade do crescente número de casos de CBC a partir dos marcadores imunistoquímicos citados, o presente estudo teve o objetivo de avaliar a expressão dos marcadores de apoptose (p53 e Bcl-2) e de proliferação celular (Ki-67 e PCNA) nos padrões histológicos nodular, morfeiforme e superficial em indivíduos submetidos a procedimento cirúrgico de rotina. Sabe-se que tal pesquisa pode contribuir para a prevenção, o tratamento e a diminuição de recidivas de carcinoma basocelular.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram estudados cinco (n = 5) pacientes portadores de CBC nodular, cinco (n = 5) com CBC morfeiforme e cinco (n = 5) com CBC superficial, já submetidos a cirurgia e com o diagnóstico anatomopatológico confirmado. O grupo-controle contém três (n = 3) indivíduos normais (livres de lesões) submetidos à blefaroplastia estética. Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados na *Plastic Center* – Clínica de Cirurgia Plástica e Medicina Estética, em Juiz de Fora (MG), após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

As amostras de pele obtidas das cirurgias passaram pelas análises histológica e imunistoquímica. O material foi fixado em formol a 10% e posteriormente submetido ao processamento histológico de rotina, sendo emblocado em parafina e levado à microtomia. Realizaram-se cortes com espessura de 3-5 μ , corados pelo método de hematoxilina e eosina (HE) e avaliados à microscopia óptica (microscópio Olympus BX40) para diagnóstico anatomopatológico.

Para a análise imunistoquímica, pesquisou-se o envolvimento de proteínas apoptóticas e de prolifera-

ção celular no carcinoma basocelular, utilizando-se a reação de imunistoquímica para a detecção das proteínas Bcl-2, p53, PCNA e Ki-67, conforme a tabela 1.

Em linhas gerais, o estudo imunistoquímico 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 0,01M, pH 6,0; (4) incubação com anticorpos primários monoclonais; (5) incubação com anticorpo secundário biotinizado (Sistema de Detecção Universal EP-USA – *Easy Path*[®]); (6) incubação com o complexo Streptoavidina-Biotina Peroxidase; (7) revelação com o substrato cromógeno diaminobenzidina (DAB); (8) contracoloração com hematoxilina de Harris e (9) desidratação e montagem das lâminas para análise em microscopia óptica. Lâminas contendo cortes de tonsilas palatinas foram utilizadas como controles positivos para os marcadores Bcl-2, PCNA e Ki-67; para o p-53, usaram-se cortes de carcinomas de mama com a mesma finalidade.

Nos testes imunistoquímicos, foram consideradas positivas as reações estritamente nucleares para os marcadores p53, PCNA e Ki-67; para o Bcl-2, a marcação citoplasmática foi definida como positiva.

Em face da baixa positividade de alguns marcadores, resolveu-se pela análise descritiva da expressão de todos os marcadores, mediante o critério de cruzes. A classificação, baseada na observação de um campo microscópico com aumento de 200x, variou de zero a quatro cruzes (4+), sendo assim definido para p53, Ki-67 e PCNA: 4+ para todos os núcleos corados; 3+ para o caso de alguns poucos núcleos não apresentarem marcação; 2+ para o caso de metade deles não apresentar coloração; 1+ para poucos núcleos corados e ausência total de reação. Para o Bcl-2, a marcação é citoplasmática e linear ao redor da membrana celular externa; utilizou-se a mesma observação e os mesmos critérios da marcação nuclear.

Na análise estatística, empregou-se 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 carcinoma basocelular.

O projeto teve aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), sob o número 277/2005. A pesquisa foi realizada no período entre fevereiro de 2006 e outubro de 2008.

RESULTADOS

As amostras de CBC foram estudadas à microscopia óptica e classificadas segundo o padrão histológico predominante. A variante nodular caracteriza-se por apresentar múltiplos nódulos arredondados de tamanhos variados, com um contorno bem definido, justapostos ao estroma, além de retração dos blocos tumorais, criando uma fenda ao redor. O CBC superficial demonstrou proliferação de células basalóides atípicas, formando um eixo paralelo à superfície epidérmica. As amostras da forma morfeiforme evidenciaram diversas colunas grossas de células basalóides, envolvidas em um estroma densamente colageinizado e contendo inúmeros fibroblastos.

As células neoplásicas que compõem o carcinoma basocelular encontram-se delimitadas por uma fenda (retração) em toda a sua interface com o estroma adjacente. Tal característica é mais marcante nas variantes nodular e superficial, sendo menos comum no CBC morfeiforme (Figuras 1A, 1B e 1C).

O tecido palpebral considerado como grupo-controle (Figura 1D), livre de patologia, apresentou alterações histológicas decorrentes do envelhecimento e da exposição ao sol, como atrofia e elastose solar, sem atipias epiteliais.

Na análise imunistoquímica, pôde-se observar a expressão dos marcadores de apoptose (p53 e Bcl-2) e de proliferação celular (Ki-67 e PCNA) nas formas clínicas de CBC e no tecido-controle (pálpebra saudável), como demonstra o gráfico 1.

A expressão da proteína p53 (representada por coloração acastanhada restrita ao núcleo) foi bastante semelhante em todas as variantes do CBC, sendo maior no tipo nodular, em que 80% (n = 4) dos pacientes expressaram 4+. Nas formas morfeiforme e superficial, 60% (n = 3) dos casos apresentaram reação máxima (4+). Nenhum dos pacientes do grupo-controle apresentou expressão desse marcador (Tabela 2).

TABELA 1: Anticorpos primários utilizados na Reação de Imunistoquímica

| Especialidade | Clone | Diluição | Tempo de incubação (em horas) |
|---------------|-------|----------|-------------------------------|
| Bcl-2* | D5 | 1:100 | 18 |
| P53* | DO-7 | 1:100 | 18 |
| Ki-67* | MM-1 | 1:200 | 18 |
| PCNA* | PC-10 | 1:400 | 18 |

*Novocastra Laboratories Ltd.

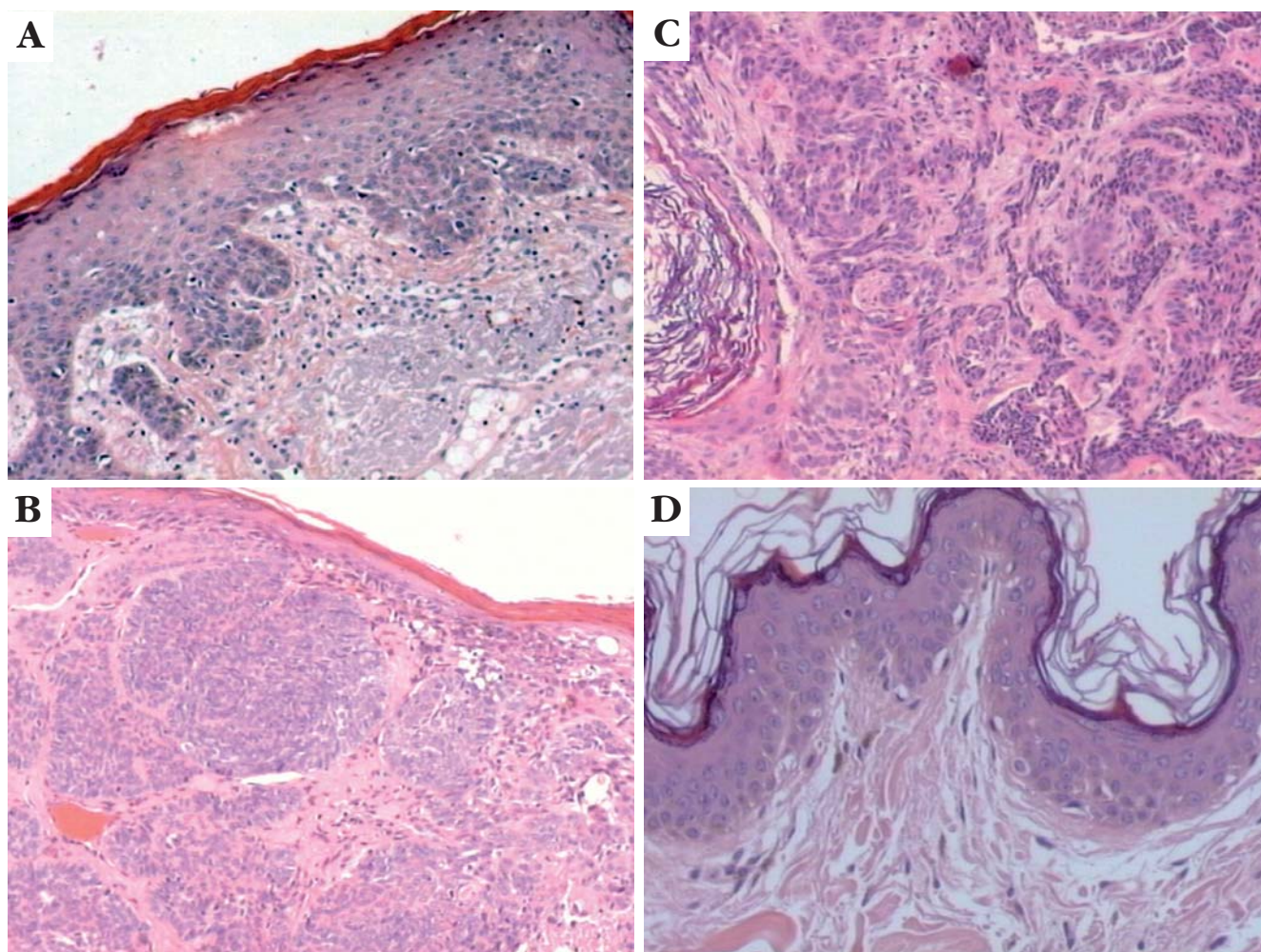


FIGURA 1: A. CBC superficial; B. CBC nodular; C. CBC morfeiforme; D. Pele palpebral. Lâminas coradas por HE, visualizadas a um aumento de 100x no microscópio óptico

A expressão do PCNA (coloração acastanhada, granular e delicada, circunscrita ao núcleo celular) foi máxima em todos os pacientes das variantes nodular e morfeiforme. No CBC superficial, em 80% dos casos ($n = 4$) houve expressão de 4+ e em 20% ($n = 1$), de 2+. Nas amostras palpebrais do grupo-controle, mais de 60% ($n = 2$) mostraram marcação em 4+ e no restante não houve expressão de PCNA (Tabela 3).

O padrão de marcação do Ki-67 (granulação acastanhada ou amarronzada, mais intensa em células com atipia ou mitose) foi máximo em 60% dos casos ($n = 3$) de CBC nodular e em 40% ($n = 2$) dos pacientes com variante superficial. No restante das amostras dessas duas formas, não houve expressão. No CBC morfeiforme, ocorreu expressão de pequena intensidade em todas as amostras, 80% ($n = 4$) em 3+ e 20% ($n = 1$) em 1+. Nos controles palpebrais, não ocorreu marcação de Ki-67, como mostra a tabela 4.

A imunomarcação citoplasmática do Bcl-2 (caracterizada por aspecto granular, coloração acastanhada, além de marcação linear em nível da membrana celular

externa) foi bastante expressiva na variante morfeiforme, apresentando-se como 4+ em 80% dos casos ($n = 4$) e como 2+ em 20% deles ($n = 1$). No tipo nodular, a marcação foi de 4+ em 60% das amostras ($n = 3$) e de 3+ no restante. No CBC superficial, a marcação foi pequena: em 60% ($n = 3$), estava ausente; em 20% ($n = 1$), demonstrou expressão de 3+ e, no restante, de 2+. No grupo-controle (pálpebras) houve expressão de 3+ em apenas um caso ($n = 1$), ocorrendo na camada das células basais da epiderme (Tabela 5).

Pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney, observou-se uma forte tendência para indicar gravidade do tumor mediante os marcadores Bcl-2 ($p = 0,04$) e Ki-67 ($p = 0,04$). Com relação ao p53, verificou-se $p = 0,02$ no CBC do tipo superficial, indicando alta significância em um tumor de baixa malignidade, como demonstrado na tabela 6.

DISCUSSÃO

Neste estudo, comparou-se a expressão dos marcadores Bcl-2, p53, Ki-67 e PCNA em indivíduos

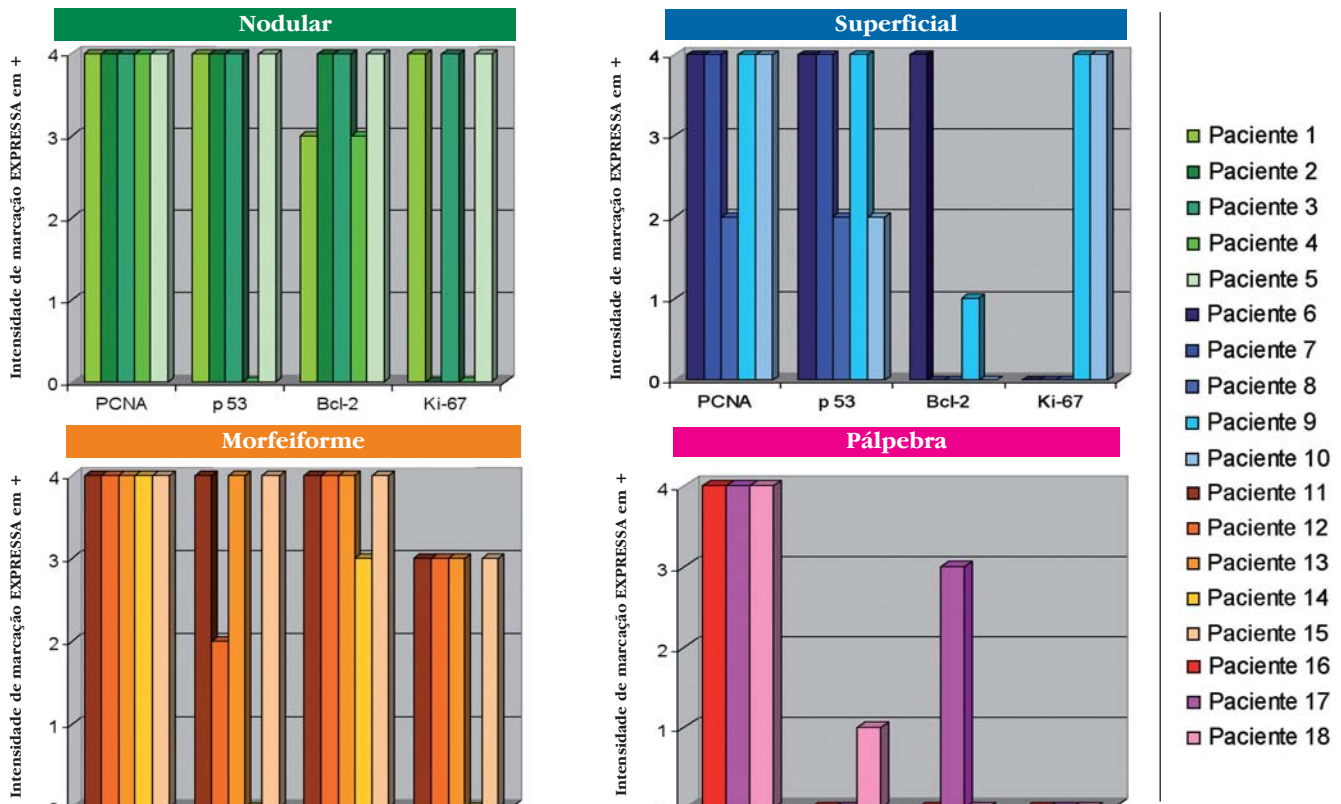


GRÁFICO 1: Histogramas de comparação entre os tumores e a intensidade de expressão de cada marcador (em cruzes)

portadores de CBC dos tipos 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 (Figura 2). A variante morfeiforme foi a que mais expressou tal marcador, seguida pela nodular, o que vem confirmar dados da bibliografia. Pesquisa anterior indicou que as variantes de CBC, sem exceção, expressaram moderados ou altos níveis da proteína Bcl-2, sendo que as formas clínicas mais agressivas, como a morfeiforme, mostraram uma imunorreatividade maior que carcinoma basocelular nodular.¹⁵

Uma significativa correlação negativa entre a expressão do p53 e/ou Bcl-2 com o desenvolvimento

do CBC tem sido descrita. Mutações do p53 ou a superexpressão do Bcl-2 são suficientes para aumentar a formação do CBC, por supressão da apoptose. Embora, na maioria dos estudos, a expressão do Bcl-2 esteja relacionada com a gravidade do tumor, um trabalho de revisão concluiu que esse “gene da sobrevivência da apoptose” (Bcl-2) está aumentado nos CBCs nodular e superficial.¹⁶

O p53 está frequentemente alterado nos tumores humanos, incluindo o câncer de pele, em que tais mutações foram mostradas como resultado da exposição solar. Alterações do p53 são encontradas em 50% dos casos de CBC, porém é difícil discernir se esse defeito do “gene supressor de tumor mais conhecido” (p53) é a causa do desenvolvimento do CBC ou se é

TABELA 2: Expressão de p53 (em cruzes) nas variantes de CBC estudadas e em tecido palpebral

| Expressão em cruzes | Amostra analisada | | | | | | | |
|---------------------|-------------------|------------|-------------|------------|-------------|------------|----------|------------|
| | Nodular | | Morfeiforme | | Superficial | | Pálpebra | |
| | N | % | N | % | N | % | N | % |
| Sem marcação | 1 | 20 | 1 | 20 | 2 | 40 | 3 | 100 |
| + | - | - | - | - | - | - | - | - |
| ++ | - | - | 1 | 20 | - | - | - | - |
| +++ | - | - | - | - | - | - | - | - |
| ++++ | 4 | 80 | 3 | 60 | 3 | 60 | - | - |
| Total | 5 | 100 | 5 | 100 | 5 | 100 | 3 | 100 |

TABELA 3: Expressão de PCNA (em cruzes) nas variantes de CBC estudadas e em tecido palpebral

| Expressão em cruzes | Amostra analisada | | | | | | | |
|---------------------|-------------------|------------|-------------|------------|-------------|------------|----------|------------|
| | Nodular | | Morfeiforme | | Superficial | | Pálpebra | |
| | N | % | N | % | N | % | N | % |
| Sem marcação | - | - | - | - | - | - | 1 | 33 |
| + | - | - | - | - | - | - | - | - |
| ++ | - | - | - | - | 1 | 20 | - | - |
| +++ | - | - | - | - | - | - | - | - |
| ++++ | 5 | 100 | 5 | 100 | 4 | 80 | 2 | 67 |
| Total | 5 | 100 | 5 | 100 | 5 | 100 | 3 | 100 |

TABELA 4: Expressão de Ki-67 (em cruzes) nas variantes estudadas de CBC e em tecido palpebral

| Expressão em cruzes | Amostra analisada | | | | | | | |
|---------------------|-------------------|------------|-------------|------------|-------------|------------|----------|------------|
| | Nodular | | Morfeiforme | | Superficial | | Pálpebra | |
| | N | % | N | % | N | % | N | % |
| Sem marcação | 2 | 40 | - | - | 3 | 60 | 3 | 100 |
| + | - | - | 1 | 20 | - | - | - | - |
| ++ | - | - | - | - | - | - | - | - |
| +++ | - | - | 4 | 80 | - | - | - | - |
| ++++ | 3 | 60 | - | - | 2 | 40 | - | - |
| Total | 5 | 100 | 5 | 100 | 5 | 100 | 3 | 100 |

TABELA 5: Expressão de Bcl-2 (em cruzes) nas variantes estudadas de CBC e em tecido palpebral

| Expressão em cruzes | Amostra analisada | | | | | | | |
|---------------------|-------------------|------------|-------------|------------|-------------|------------|----------|------------|
| | Nodular | | Morfeiforme | | Superficial | | Pálpebra | |
| | N | % | N | % | N | % | N | % |
| Sem marcação | - | - | - | - | 3 | 60 | 2 | 67 |
| + | - | - | - | - | - | - | - | - |
| ++ | - | - | 1 | (20%) | 1 | 20 | - | - |
| +++ | 2 | (40%) | - | - | 1 | 20 | 1 | 33 |
| ++++ | 3 | (60%) | 4 | (80%) | - | - | - | - |
| Total | 5 | 100 | 5 | 100 | 5 | 100 | 3 | 100 |

meramente um marcador de danos causados pela luz ultravioleta.¹⁷ Porém, pesquisa anterior concluiu que a síntese ou a estabilização do p53 é essencial para induzir a apoptose no carcinoma basocelular.

Dos tumores estudados, 66,7% (n = 10) expressaram fortemente o p53 e, no grupo-controle, apenas um indivíduo mostrou fracamente esse marcador, somente em células da camada basal (Figura 3), ratificando as afirmações de pesquisas anteriores.¹⁸

As mutações da proteína p53 são comuns em algumas neoplasias malignas, sendo a sua detecção imunoistoquímica reflexo da alteração gênica, visto que a p53 normal não é facilmente detectada por ter curta meia-vida e baixos níveis.¹³ Entretanto, nem todos os tumores positivos para a p53 exibem muta-

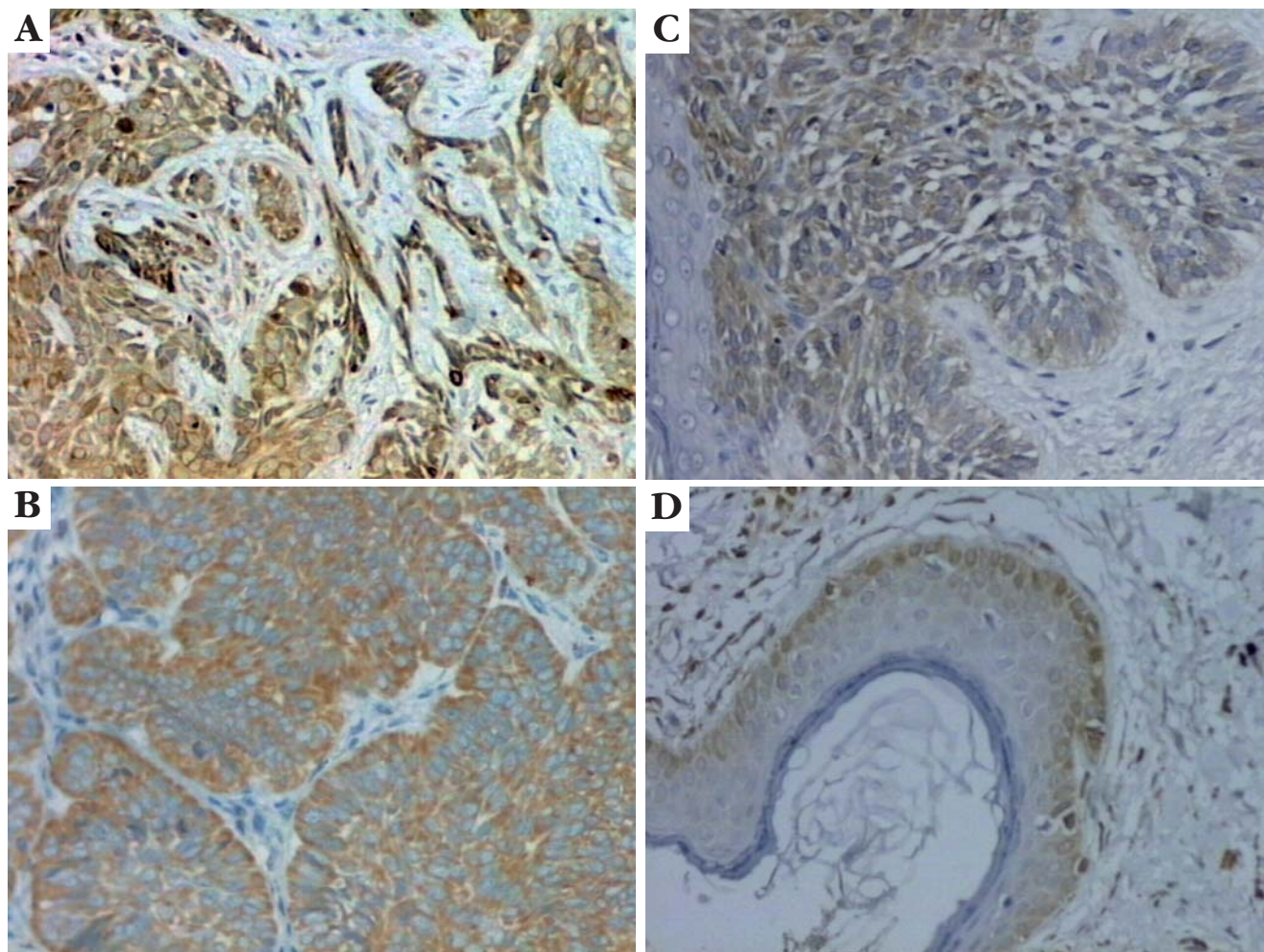
ções gênicas, e a ausência de marcação não significa ausência de envolvimento gênico. A avaliação imunoistoquímica da proteína p53 necessita de interpretação criteriosa, pois resultados falso-positivos e falso-negativos podem acontecer.¹⁹ Tais achados inconsistentes podem ser atribuídos, principalmente, à complexa biologia dessa proteína.

Com os resultados do presente estudo, em concordância com a literatura afim, pode-se apenas sugerir que, no CBC do tipo superficial, parece existir um alto percentual de mutação de p53.²⁰ Grande número de tumores, no entanto, precisa ser avaliado, para que, somente assim, se estabeleça a correlação clínica dessa proteína com o carcinoma basocelular.

A expressão do Ki-67 permite inferir sobre o

TABELA 6: Valores de p (significância) resultados do teste de Mann-Whitney para comparação dos marcadores entre os tipos de tumores e o grupo-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 |

**FIGURA 2:** Expressão de Bcl-2: A. CBC morfeiforme, 4+; B. CBC nodular, 4+; C. CBC superficial, 3+; D. Camada basal da pele palpebral. Lâminas visualizadas em aumento de 200x em microscópio óptico

momento de vida de uma determinada célula, informando apenas se esta se encontra em ciclo celular. Com isso, é possível que determinada neoplasia apresente alta taxa de proliferação e baixo percentual de células positivas para tal marcador.⁸

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.¹⁵ Os resultados do presente estudo mostram maior expressão do Ki-67 nos CBCs nodular e superficial, sendo que, neste último, a marcação em 4+ ocorreu em apenas 40% dos casos

(n = 2). Nos controles, não aconteceu qualquer marcação. Portanto, não se pode afirmar, como na literatura, que o Ki-67 seja um marcador que auxilia no diagnóstico e na gravidade do CBC, devido à grande variação da sua expressão celular.⁸

O alto índice de positividade do PCNA encontrado nos tumores estudados na presente pesquisa também foi descrito por outros autores e foi considerado causa de baixa sensibilidade para pesquisa do índice de proliferação, quando comparado a outros marcadores.¹⁵ Sem conhecer o exato momento do ciclo celular, não é possível determinar se o elevado número de

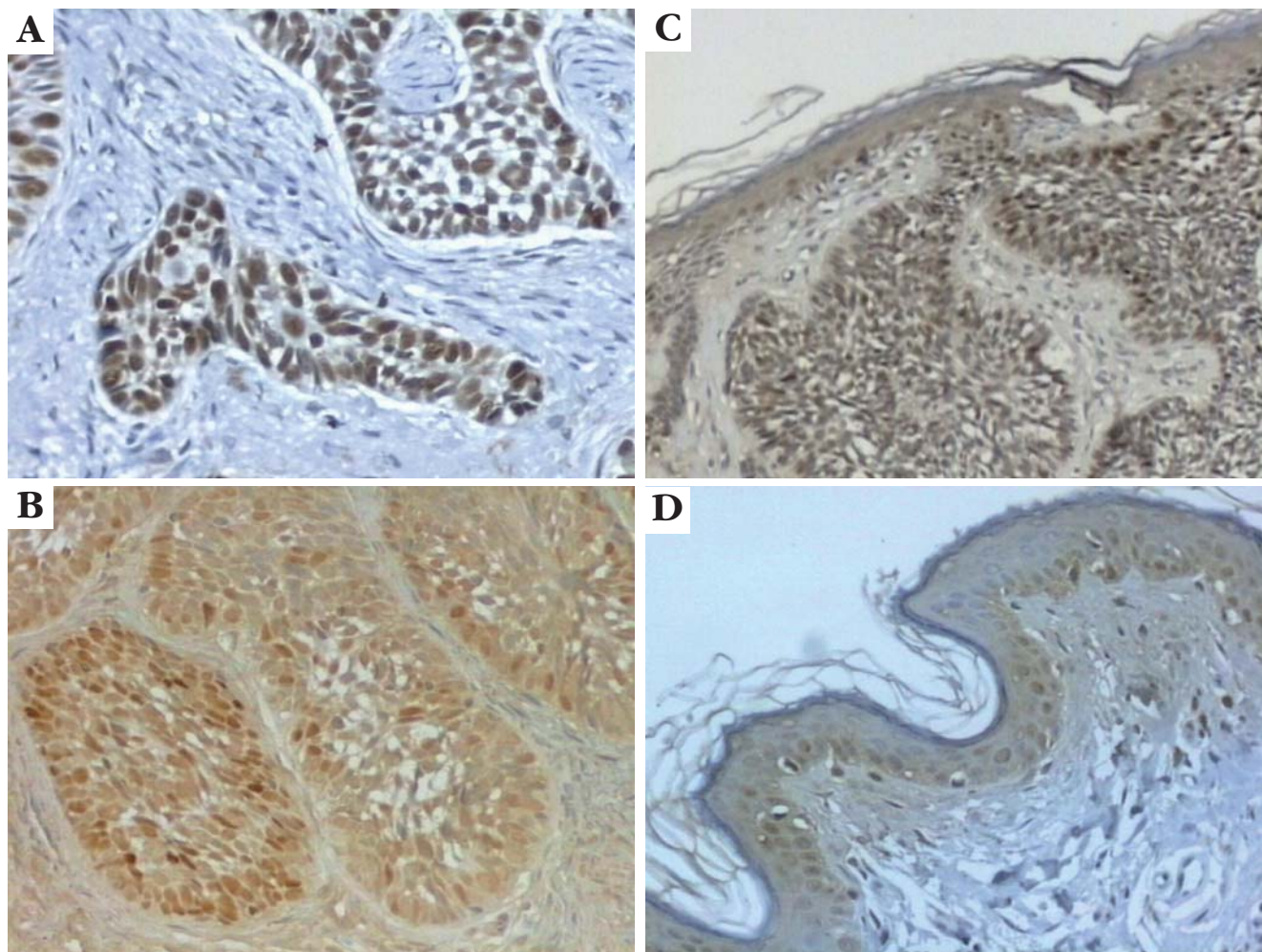


FIGURA 3: Expressão da p53: A. Marcação em 4+ no CBC morfeiforme; B. CBC nodular; C. Forte marcação no CBC superficial; D. Marcação de algumas células da camada basal em pele palpebral. Lâminas visualizadas em aumento de 200x em microscópio óptico

células PCNA-positivas em uma neoplasia é fruto do alto *turnover* ou se indica uma grande proporção de células dividindo-se em prolongado ciclo.^{8,15}

Existe uma variação na intensidade de coloração das células PCNA-positivas, que pode ser atribuída à sua longa meia-vida. Devido à impossibilidade de saber se a célula com coloração menos intensa está ciclando ou não, sugere-se que se considerem todas as células marcadas, independentemente da intensidade da coloração, exatamente como foi realizado neste trabalho para avaliar a marcação pelo PCNA.^{8,15}

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

No momento, parece que ainda não se dispõe

de um teste que seja totalmente confiável e conclusivo. Porém, os diversos marcadores avaliados neste trabalho podem auxiliar na análise da gravidade dos três subtipos de CBC aqui estudados.

CONCLUSÃO

De acordo com os resultados imunoistoquímicos da expressão do p53, PCNA, Ki-67 e Bcl-2 nas variantes morfeiforme, nodular e superficial do CBC e na pele palpebral de pacientes livres da patologia, pode-se concluir que o Bcl-2 e a proteína p53 apresentam uma tendência para diagnóstico de gravidade do carcinoma basocelular.

O PCNA, devido à sua vida longa e marcação de células fora do ciclo celular, não pode ser considerado como um bom marcador para diagnóstico de gravidade do CBC, assim como o Ki-67, que apresenta comportamento instável. □

REFERÊNCIAS

- Lage IR, Ramírez ELA, Ayalas JAR, Lage MR. Epidemiología Del Cáncer de Piel no Melanoma (Hospital Provincial de Villa Clara). *Rev Cuba Oncol*. 2001;17:43-7.
- Murphy GF, Sellheyer K, Mihm MC. A pele. In: Kumar V, Abbas AK, Fausto N, editores. *Robbins e Cotran – Patologia: Bases patológicas das Doenças*. 7 ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2005. p. 1283-1330.
- Ishi LA, Pereira IC, Schellini AS, Marques MEA, Padovani CR. Carcinoma basocelular de pálpebras – fatores relacionados com a recidiva tumoral. *An Bras Dermatol*. 2004;79:423-30.
- Silva FB, Souza SMG. Aplicação da Biologia Molecular na Odontologia: Conceitos e Técnicas. *Rev Fac Odont de Lins*. 2002;14:7-14.
- Crowson AN. Basal cell carcinoma: biology, morphology and clinical implications. *Mod Pathol*. 2006;19:127-47.
- Stratigos AJ. Immunophenotypic analysis of the p53 gene in non-melanoma skin cancer and correlation with apoptosis and cell proliferation. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2005;19:180-6.
- Kopke LFF, Schmidt M. Carcinoma Basocelular. *An Bras Dermatol*. 2002;77:249-85.
- Arisawa EAL, Moraes E, Rocha RF, Almeida JD. Marcadores biológicos: PCNA e Ki-67. Breve revisão. *Rev Fac Odont*. 1999;2:54-60.
- Hwa Jee S, Chuan Shen S, Ren Tseng C, Ching Chiu H, Liang Kuo M. Curcumin Induces a p53-dependent apoptosis in Human Basal cell carcinoma cells. *J Invest Dermatol*. 1998;111:656-61.
- Cavalcanti GB. Citometria de Fluxo, Imunocitoquímica e Western Blot na Detecção da Expressão da Proteína p53 em Células Tumorais: uma Análise Comparativa. *Rev Bras Anal Clin*. 2003;35:135-42.
- Isoherranen K. UV irradiation induces downregulation of Bcl-2 expression in vitro and in vivo. *Arch Dermatol*. 1999;291:212-6.
- Murphy M, Mabruk MJEMF, Lenane P, Liew A, Buckley A, Flatharta CO 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 Pathol*. 2002;55:829-33.
- Tweddle DA, Malcolm AJ, Cole M, Pearson ADJ, Lunec J. p53 Cellular Localization and Function in Neuroblastoma: Evidence for Defective G1 Arrest Despite WAF1 Induction in MYCN-Amplified Cells. *Am J Pathol*. 2001;158:2067-77.
- Sousa FAC, Brandão AAH, Almeida JD, Rosa LEB. Alterações gênicas e câncer bucal – uma breve revisão. *Rev Bras Patol Oral*. 2004;3:20-25.
- Rubin AI, Chen EH, Ratner D. Basal-cell carcinoma. *N Engl J Med*. 2005;353:2262-69.
- Lear W, Dahlke E, Murray CA. Basal Cell Carcinoma: Review of Epidemiology, Pathogenesis, and Associated Risk Factors. *J Cut Med Surg*. 2007;11:19-30.
- Tilli CMLJ, Van Steensel MAM, Krekels GAM, Neumann HAM, Ramaekers FCS. Molecular aetiology and pathogenesis of basal cell carcinoma. *Br J Dermatol*. 2005;152:1108-24.
- Kim KH, Park EJ, Seo YJ, Cho HS, Kim CW, Kim KJ, Park HR. Immunohistochemical study of cyclooxygenase-2 and p53 expression in skin tumors. *J Dermatol*. 2006;33:319-25.
- Ansarin H, Daliri M, Soltani-Arabshahi R. Expression of p53 in aggressive and non-aggressive histologic variants of basal cell carcinoma. *Eur J Dermatol*. 2006;543-47.
- Park HR, Min SK, Cho DC, Kim KH, Shin HS, Park YE. Expression profiles of p63, p53, survivin and htert in skin tumors. *J Cut Pathol*. 2004;31:544-9.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA / MAILING ADDRESS:

Marília de Pádua Dornelas Corrêa
Rua Dom Viçoso, 20
Alto dos Passos
36026 390 Juiz de Fora – MG – Brasil
Tel./Fax: 32 3239 8282
Email: tbadeu55@terra.com.br

Como citar este artigo / *How to cite this article*: Corrêa MPD, Ferreira AP, Gollner AM, Rodrigues MF, Guerra MCS. Expressão de marcadores de proliferação celular e apoptose em carcinoma basocelular. *An Bras Dermatol*. 2009;84(6):606-14.