MARILHO TADEU DORNELAS

EXPRESSÃO DE MARCADORES DE PROLIFERAÇÃO CELULAR E APOPTOSE NO CARCINOMA ESPINOCELULAR DA PELE E CERATOSE ACTÍNICA

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Mestrado em Saúde do Programa de Pós-Graduação em Saúde: área de concentração em Saúde Brasileira da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Saúde.

Orientadora: Profª. Dra. Ana Paula Ferreira
Co-orientadora: Profª. Dra. Ângela Maria Gollner

Juiz de Fora
2009

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

Dornelas, Marilho Tadeu

Expressão de Marcadores de Proliferação Celular e Apoptose no Carcinoma Espinocelular da Pele e Ceratose Actínica/ Marilho Tadeu Dornelas – 2009.
72f. : il.

Dissertação (Mestrado em Saúde) – Universidade Federal de Juiz de Fora, 2009.

1. Carcinoma espinocelular 2. Apoptose 3. Proliferação de células. I. Título

CDU 616-006.6

MARILHO TADEU DORNELAS

EXPRESSÃO DE MARCADORES DE PROLIFERAÇÃO CELULAR E APOPTOSE NO CARCINOMA ESPINOCELULAR DA PELE E CERATOSE ACTÍNICA

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Mestrado em Saúde do Programa de Pós-Graduação em Saúde: área de concentração em Saúde Brasileira da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Saúde.

Aprovado em: 26 / 03 / 2009

BANCA EXAMINADORA:

Profª. Drª Ana Paula Ferreira - Orientadora
Departamento de Parasitologia, Microbiologia, Imunologia – UFJF

Profª. Drª Ângela Maria Gollner – Co-orientadora
Departamento de Patologia– UFJF

Profª. Drª. Maria Aparecida de Souza
Departamento de Imunologia - UFU

Profª. Drª Maria Christina Marques Nogueira Castañon
Departamento de Morfologia - UFJF

Aos meus pais pelo encorajamento, presença, altruísmo e exemplos durante toda a minha vida.

À minha esposa pela dedicação e companheirismo.

Aos meus filhos, estimulo constante em minha vida.

As minhas irmãs pelo incentivo e amizade incondicional.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo Dom da Vida.

Aos amigos espirituais que nos ajudam na evolução moral, intelectual e espiritual.

Às doutoras Ana Paula Ferreira e Ângela Maria Gollner, pela orientação segura, desprendimento, dedicação e competência.

A Michele Fernandes Rodrigues, por sua atenção, profissionalismo e disponibilidade.

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

Aos funcionários do laboratório de Imunologia da UFJF, pelo apoio e bom ânimo.

Aos funcionários da Clínica Plastic Center, por todo apoio e incentivo.

Agradeço a todos que possibilitaram a realização deste estudo.

"Não existe milagre,
Existe trabalho e progresso
Felicidade é consequência"

Isabel Salomão de Campos

RESUMO

O câncer de pele é o mais frequente tipo de câncer humano e mostra aumento de sua incidência nos últimos anos, o que o torna um crescente problema para a saúde pública mundial. Em muitos casos, antes do surgimento do carcinoma, instala-se uma lesão precursora, - a Ceratose Actínica, que pode evoluir para Carcinoma Espinocelular. Considerando o aumento de novos casos e recidivas frequentes, estudos tem sido intensificados no sentido de determinar os parâmetros com significado prognóstico na predição daqueles tumores que terão comportamento mais agressivo, que poderão recorrer e evoluir com metástases. O objetivo deste estudo foi avaliar a expressão dos marcadores de proliferação celular (PCNA, Ki-67) e apoptose (p53, Bcl-2), em portadores de Carcinoma Espinocelular e Ceratose Actínica. Foram estudadas amostras de 30 pacientes, submetidos à cirurgia reparadora, sendo dez portadores do Carcinoma Espinocelular, dez de Ceratose Actínica e dez indivíduos livres de lesões submetidos à blefaroplastia. A proteína p53 foi expressa em todos os casos estudados, com padrões quantitativos diferentes. O Bcl-2 foi expresso em baixa intensidade em seis casos de Ceratose Actínica, também baixa nas peles de blefaroplastia e negativo nos casos de Carcinoma Espinocelular. O PCNA exibiu expressão intensa em todas as amostras estudadas. O Ki-67 apresentou expressão variável nos casos de carcinoma e de ceratose e negativo na pele de pálpebra. A intensidade da expressão de PCNA, Ki-67, p53 e Bcl-2, associada a outros indicadores, tais como a análise histopatológica e a apresentação clínica, fornece informações sobre a provável progressão, levando a um diagnóstico mais seguro da neoplasia.

Palavras-chave: Carcinoma Espinocelular. Ceratose Actínica. Marcadores Imuno-histoquímicos. Apoptose. Proliferação Celular.

ABSTRACT

The skin cancer is the most frequent type of human cancer and shows an increase in its incidence in recent years, making it an important public health problem worldwide. In many cases before the onset of carcinoma install a precursor lesion, actinic keratosis, which can develop into squamous cell carcinoma. Considering the increase of new cases and relapses frequent, studies have been intensified in order to determine the parameters with prognostic significance in predicting those tumors which have more aggressive behavior, and can develop metastases. The objective was to evaluate the expression of markers of cell proliferation (PCNA, Ki-67) and apoptosis (p53,Bcl-2) in patients with squamous cell carcinoma and actinic keratosis. We studied samples from 30 patients, ten patients of squamous cell carcinoma, ten with actinic keratosis and ten samples free of lesions underwent blepharoplasty. The p53 protein was expressed in all cases with different quantitative patterns. The Bcl-2 was expressed at low intensity in six cases of actinic keratosis in the skins of blepharoplasty and negative in cases of squamous cell carcinoma. The PCNA showed intense expression in all samples. The Ki-67 showed variable expression in cases of keratosis and carcinoma and negative in the skin of eyelid. In conclusion the intensity of expression of PCNA, Ki-67, P53 and Bcl-2, associated with other indicators such as histopathological analysis and clinical presentation, provides information on the likely progression, leading to a more secure diagnosis of malignancy.

Keywords: Spinocellular Carcinoma. Actinic Keratose. Immunohistochemical Biomarkers. Apoptosis. Cell Proliferation.

LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS

Figura 1	Pele do dorso (caso oito), Ceratose Actínica, mostrando espessa camada ortoceratótica, acantose irregular, com brotamentos múltiplos. HE (a, b e c).....	45
Figura 2	Pele de região supra-clavicular esquerda (caso20), mostrando CEC bem diferenciado, caracterizado por hiperceratose, acantose irregular formada por ceratinócitos atípicos que rompem a basal e invadem o derma. HE (a, b e c).....	45
Figura 3	Pele da pálpebra, mostrando discreta atrofia, elastose solar e ausência de atipia epitelial. HE (a, b e c).....	46
Figura 4	Intensidade da expressão dos Marcadores Moleculares PCNA, Ki67, p53 e Bcl2 em tecidos de pacientes dos grupos CA e CEC...	48
Figura 5a	Ceratose Actínica. Marcador PCNA, positivo (4+).....	49
Figura 5b	Ceratose Actínica. Marcador Ki-67, positivo (3+).....	49
Figura 5c	Ceratose Actínica. Marcador p53, positivo (3+).....	49
Figura 5d	Ceratose Actínica. Marcador Bcl-2, negativo.....	49
Figura 6a	Carcinoma Espinocelular. Marcador PCNA, positivo (4+).....	50
Figura 6b	Carcinoma Espinocelular. Marcador Ki-67, positivo (4+).....	50
Figura 6c	Carcinoma Espinocelular. Marcador p53, positivo (3+).....	50
Figura 6d	Carcinoma Espinocelular. Marcador Bcl-2, negativo.....	50
Figura 7	Ceratose Actínica. Expressão dos marcadores.....	51
Figura 8	Carcinoma Espinocelular. Expressão dos marcadores.....	51

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1	Anticorpos primários utilizados na reação de imuno-histoquímica.....	44
Tabela 1	Distribuição dos casos quanto ao sexo, idade, localização, dimensão, diagnóstico em relação aos marcadores Imuno-histoquímicos.....	47
Tabela 2	Valor de p do Teste de Wilcoxon para diferença entre os pares de marcadores.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS

Apaf-1	Fator 1 Ativador da Apoptose
Bax	Gene de Proteína X Associada ao Bcl-2
Bcl-2	Gene Bcl-2
Bcl-2	Proteína Inibidora da Apoptose
Bid	Gene de Domínio de Interação B43 da família Bcl-2
CA	Ceratose Actiníca
CBC	Carcinoma Basocelular
CDK	Proteína Quinase Ciclina Dependente
CE	Carcinoma Epidermóide
CEC	Carcinoma Espinocelular
CMM	Cirurgia Micrográfica de Mohs
DAB	Diaminobenzidina
DNA	Ácido Desoxiribonucleico
EGF	Fator de Crescimento Epidérmico
FAAD	"Faz-Associeted Death Domain"
Fasl	Fasligante
G0	Fase Fora do Ciclo Celular
G1	Fase Ciclo Celular (pré-síntese DNA)
G2	Fase Ciclo Celular (pós-replicação DNA)
HE	Hematoxilina-Eosina
IHQ	Imuno-histoquímica
INCA	Instituto Nacional do Câncer
KDa	Kilo Dalton
Ki-67	Antígeno que corresponde a proteína não histona nuclear expressada pelas células nas fases proliferativas G1, G2, M e S
μ	Micra
MMP	Metaloproteinases da matriz
MPF	Fator Promotor de Maturação
OMS	Organização Mundial de Saúde
P53	Gene Supressor de Tumor

p53	Proteína p53
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	"Loccus" Cromossomial
TGF-ά	Fator transformador de Crescimento
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TNFR1	Receptor Tipo I do Fator Necrosante de Tumor
UVB	Raios Ultravioleta B
UVA	Raios Ultravioleta A
5-FU	5 fluorouracila

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1	A Pele	18
2.2	Tumores da Epiderme	19
2.2.1	Carcinoma Espinocelular	19
2.2.2	Ceratose Actínica	23
2.3	Ciclo Celular – Mecanismos Reguladores e Proliferação Celular	25
2.4	Oncogênese	28
2.5	Apoptose	29
2.6	Marcadores Tumorais	31
2.6.1	p 53	32
2.6.2	PCNA	34
2.6.3	Ki-67	37
2.6.4	Bcl-2	39
3	OBJETIVOS	41
4	MÉTODOS	42
4.1	Amostras	42
4.2	Histopatologia	42
4.3	Imuno-histoquímica	43
4.4	Tratamento estatístico	44
5	RESULTADOS	45
5.1	Avaliação do perfil histopatológico	45
5.2	Avaliação dos marcadores por imuno-histoquímica	46
5.3	Resultado estatístico	52
5.3.1	Análise dos dados	52
6	DISCUSSÃO	55
7	CONCLUSÃO	63
	REFERÊNCIAS	64

1 INTRODUÇÃO

O câncer de pele é o mais frequente tipo de câncer humano e sua incidência tem mostrado intenso aumento nos últimos anos, o que o torna um crescente problema para a saúde pública mundial (CABRERA MORALES *et al.*, 2006). O número de novos casos do câncer estimado para o Brasil em 2008 foi de 55.890 em homens e 59.120 nas mulheres, com risco estimado de 62 casos novos para cada 100 mil homens e 60 para cada 100 mil mulheres (INCA, 2008).

No estudo das manifestações do câncer de pele, o Carcinoma Espinocelular (CEC) representa 20% das neoplasias malignas cutâneas e tem procedência na proliferação de células escamosas atípicas. Além do mais, apresenta caráter invasor e pode produzir metástases. Os CECs primários da pele, em geral, originam-se em regiões expostas ao sol e podem surgir a partir de lesões não invasivas como Ceratoses Actínicas (CA), queilites actínicas, leucoplasias orais e radiodermites crônicas (AIROLA *et al.*, 1997; MARTINEZ *et al.*, 2006).

No tocante às causas do desenvolvimento do câncer temos como fator principal exposição a raios. A radiação ultravioleta (UV), por exemplo, determina dano específico ao DNA com mutações no gene supressor p53 nos portadores do carcinoma, o qual se desenvolveu em áreas expostas aos raios solares (RESZEC *et al.*, 2004). O decréscimo da função no p53 (controle do ciclo celular e apoptose) pode levar à incontrolada proliferação celular, ao acúmulo de DNA mutado e, finalmente, ao câncer (LEVINE *et al.*, 1994; AIROLA *et al.*, 1997; KIM *et al.*, 2006).

A evolução da Ceratose Actínica para CEC tem sido questionada, haja vista que pode ser encontrada na adjacência de lesões clássicas do Carcinoma, bem como permanecerem como Ceratose Actínica, mesmo em longos períodos de acompanhamento. (KUSHIDA *et al.*, 1999; HABIF, 2005).

A expressão das proteínas p53, marcador de apoptose e Ki-67, marcador de proliferação celular, foi estudada em doenças neoplásicas e não neoplásicas de pele e os resultados sugerem que a taxa de expressão de p53 e Ki-67 reflete o grau de malignidade nas neoplasias cutâneas examinadas (ARISAWA *et al.*, 1999; BATINAC *et al.*, 2004). Da mesma forma, o estudo de Balassiano (2004) foi realizado com o objetivo de validar a expressão dos marcadores Bcl-2, p53, p53 mutada, caspase-3 e Ki-67. Todos como fatores prognósticos em hiperplasia fibrosa inflamatória, queilites actínicas e Carcinomas Espinocelulares de lábio inferior. A autora encontrou expressão de p53 e p53 mutada maior nos CECs, elevada

expressão de Ki-67 em todas as lesões e expressão de Bcl-2 crescente em relação à gravidade das lesões (BALASSIANO, 2004).

Considerando o aumento de novos casos e recidivas frequentes, estudos tem sido intensificados na tentativa de determinar os parâmetros com significativo prognóstico na predição daqueles tumores que apresentam comportamento mais agressivo e que poderão recorrer e evoluir com metástases (BERCOVICI *et al.,* 2005; MARTINEZ *et al.,* 2006)

Nesse sentido, o objetivo do presente estudo foi avaliar a expressão dos marcadores de apoptose (p53, Bcl-2) e proliferação celular (PCNA, Ki-67) em portadores de CEC e CA, através da técnica de Imuno-histoquímica, e comparar os resultados obtidos entre estes grupos e aqueles representados por indivíduos sadios submetidos à cirurgia plástica de pálpebras (blefaroplastia). Além disso, pretendeu-se verificar se há correlação entre os marcadores de apoptose e proliferação celular nos casos de Ceratose, Carcinoma e nos indivíduos livres de doença.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 **A Pele**

A pele é um órgão que envolve o corpo, determinando seu limite com o meio externo. Corresponde a 16% do peso corporal e exerce diversas funções. Dentre elas: regulação térmica, defesa orgânica, controle do fluxo sanguíneo, proteção contra diversos agentes do meio ambiente, e funções sensoriais de calor, frio, pressão, dor e tato (SCHWARTZ *et al.*, 2003). É um órgão vital, formado por duas camadas: derme e epiderme. Sem ela, a sobrevivência seria impossível. A epiderme – camada mais externa da pele – é constituída por células epiteliais escamosas (ceratinócitos), melanócitos e células de Langerhans. Os ceratinócitos além de serem responsáveis pela produção de ceratina, são sítios para biossíntese de moléculas solúveis (citocinas), importantes na regulação de células epidérmicas adjacentes bem como para células dérmicas. Os melanócitos são responsáveis pela produção de melanina e representam um importante filtro endógeno contra os efeitos danosos dos raios ultravioletas do sol. As células de Langerhans são células epidérmicas dendríticas que captam e processam antígenos, comunicando informações críticas às células linfóides. A célula de Merkel localiza-ae na camada basal da epiderme. Ao contrario do melanócito e da célula de Langerhans, não é uma célula dentrítica, possuindo tonofilamentos de ceratina e desmossomos ocasionais que a ligam às células adjacentes. Estão intimamente associadas com a dilatação de um bulbo terminal de uma fibra nervosa aferente mielinizada. Diferentes do corpúsculo de Merkel (combinação de um neurônio e uma célula epidérmica). (FITZPATRICK,2003; SCHWARTZ *et al.*, 2003 ;ELDER *et al.*, 2005).

A epiderme dá origem aos anexos cutâneos: unhas, pêlos, glândulas sudoríparas e glândulas sebáceas. A abertura dos folículos pilosebáceos (pêlo + glândula sebácea) e das glândulas sudoríparas na pele formam os orifícios conhecidos como poros. Vista da profundidade para a superfície, a epiderme possui as seguintes camadas: camada basal ou germinativa, camada espinhosa, camada granulosa, camada lúcida, camada córnea. A camada basal é constituída por células prismáticas ou cuboides, que repousam sobre a membrana basal, a qual separa a epiderme da derme. Essa camada apresenta intensa atividade mitótica,

sendo responsável pela renovação da epiderme, fato relevante ao estudo. (SCHWARTZ *et al.*, 2003 ; ELDER *et al.*, 2005).

A derme, localizada abaixo da epiderme, é responsável pela resistência e elasticidade da pele. Ela é constituída pelo tecido conjuntivo (fibras colágenas e elásticas envoltas por substância fundamental), vasos sanguíneos e linfáticos, nervos e terminações nervosas. Os folículos pilossebáceos e as glândulas sudoríparas, originadas na epiderme, também se localizam na derme. (FARMER; HOOD, 2000; SCHWARTZ *et al.*, 2003 ; ELDER *et al.*, 2005).

Abaixo e em continuidade com a derme está a hipoderme, que embora tenha a mesma origem da derme (origem mesodérmica) não faz parte da pele, apenas lhe serve de suporte e união com os órgãos adjacentes (SCHWARTZ *et al.*, 2003 ; ELDER *et al.*, 2005).

2.2 **Tumores da epiderme**

2.2.1 **Carcinoma Espinocelular**

O Carcinoma Espinocelular (CEC), também chamado Carcinoma Epidermóide (CE) ou carcinoma de células escamosas tem origem em queratinócitos, que geralmente sob o efeito da radiação ultravioleta, UVB, sofreram dano no DNA e em seu sistema de reparo. A radiação UVB induz a mutação dos genes supressores tumorais p53, fazendo com que os queratinócitos sofram expansão clonal e que, escapando dos mecanismos regulatórios do organismo, passem a crescer de forma invasiva e destrutiva, podendo demonstrar relativa autonomia ao metastatizar. Muito embora este evento ocorra tardiamente em vários casos. A proliferação descontrolada das células anormais leva ao aparecimento de lesões préneoplásicas, do carcinoma "in situ" e ao Carcinoma Espinocelular invasivo (MEHEREGAN *et al.*, 1995; MÉLEGA, 2002 ;HABIF, 2005).

Vários tipos de lesões de pele podem se predispor ao desenvolvimento do CEC, incluindo epidermólise bolhosa distrófica, poroceratose, lupus eritematoso discoide, liquen escleroso e atrófico, balanite obliterante xerótica, epidermodisplasia verruciforme, e acrodermatite crônica atrófica. A imunosupressão toma um papel importante, entre os transplantados renais, o risco de desenvolver CEC e aumentado em 18 vezes (MÉLEGA,

2002). A radiação por raios-X é comum em trabalhadores que lidam com os raios, principalmente, em mãos de dentistas que os utilizam inadvertidamente e sem precauções, bem como em indivíduos em tratamento de algumas doenças com raios-X, tais quais psoriases, espondilite anquilosante, acne severa (HABIF, 2005).

Um caso relevante é o de Úlcera de Marjolin, que se refere à alteração maligna que ocorre em úlceras crônicas da pele, fístulas e queimaduras prévias (MACIEL; SERRA, 2004). A cicatriz provocada pode ser originária de queimaduras antigas, de qualquer outro tipo de trauma ou de processo inflamatório crônico (MÉLEGA, 2002). A maioria das lesões é encontrada em sequelas de queimaduras, sendo a maioria nas extremidades. O CEC que ocorre em lesões de inflamação crônica é mais agressivo que aqueles que se desenvolvem de uma Ceratose Actínica cicatricial (MACIEL; SERRA, 2004; HABIF, 2005).

O CEC originado em áreas de radiação ou lesão térmica prévia, em trajetos fistulosos crônicos e úlceras crônicas são agressivos e apresentam alta incidência de metástases, enquanto os originados em Ceratose Actínica são menos agressivos e menos propensos a metástases (HABIF, 2005).

A exposição intensa à luz solar na infância, queimaduras de sol, pele clara, na classificação I e II de Fitzpatrick, ocupações em ambientes externos, sardas ou efélides, telangiectasias, são igualmente considerados predisponentes ao CEC (FITZPATRICK *et al.*, 2003; HABIF, 2005).

Não obstante, estudos revelam que o CEC é o segundo tumor maligno mais frequente na pele, variando em incidências nas diferentes partes do mundo, correspondendo a aproximadamente 20% dos cânceres de pele não melanomas e sua incidência vem aumentando nos últimos tempos (INCA, 2006).

O CEC geralmente se inicia com um espessamento da pele e placa indurada, cresce lateralmente e verticalmente, gradualmente, vai se tornando um nódulo e, eventualmente, forma crostas e úlceras. A maioria das lesões ocorre em áreas expostas aos raios solares, tais como face, orelhas, lábios, mãos e braços sendo mais raras em áreas não expostas ao sol, como as glúteas e as da genitália. Uma variação rara ocorre na região plantar, chamada *Epithelioma Cuniculatum*, que ocorre predominantemente em negros (MEHREGAN *et al.*, 1995).

O carcinoma "in situ", com placas vermelhas e lisas, denominado doença de Bowen que aparece nas mucosas da glande, vulva e mucosa anal, é conhecido como Eritroplasia de Queyrat (HABIF, 2005). A doença de Bowen no pênis é mais comum em prepúcio de não circuncidados. Cresce muito lentamente e tem potencial para a invasão, tornando-se CEC.

(DU VIVIER, 1994; HABIF, 2005). A doença de Bowen é um carcinoma intraepidérmico que, ocasionalmente, evolui para CEC (DU VIVIER, 1994; HABIF, 2005). Geralmente causado por exposição solar ou ingestão de arsênico. O arsênico é utilizado para tratar psoríase e sífilis, e é usado também como pesticida, fungicida em preparações homeopáticas e medicamentos fortificantes para crianças (DU VIVIER, 1994; HABIF, 2005).

Ao exame histológico do CEC, observa-se a presença de células espinhosas atípicas com vários níveis de queratinizacão, formando as pérolas córneas. O Carcinoma pode ser classificado quanto à diferenciação celular em: bem diferenciados, moderadamente diferenciados e pouco diferenciados. Essa diferenciação celular pode seguir os critérios de Broder, que divide os CEC em graus de I a IV, conforme a percentagem de células indiferenciadas. Grau I: < 25% de células indiferenciadas, Grau II: < 50% de células indiferenciadas, Grau III: < 75% de células indiferenciadas, Grau IV: > 75% de células indiferenciadas (MEHREGAN *et al.*, 1995).

O grau de profundidade da lesão está relacionado com o tempo de evolução da doença. Quanto mais cedo o diagnóstico puder ser realizado e as lesões forem mais superficiais, com menor potencial para metástases, mais eficiente será o tratamento e melhor o prognóstico (DU VIVIER, 1994). Os fatores prognósticos do Carcinoma Espinocelular estão relacionados ao local, grau de diferenciação e profundidade da lesão e ao fator determinante (MACIEL; SERRA, 2004). O potencial metastático pode ser relacionado com tamanho, localização, grau de diferenciação, evidência histológica de envolvimento perineural, estado imunológico, profundidade da invasão e tratamento prévio.Os tumores entre 2 e 6 mm de espessura com diferenciação moderada e uma profundidade de invasão, que não estende além do subcutâneo, podem ser classificados como carcinomas de baixo risco (DINEHART; POLLACK, 1982; ROWE *et al.*, 1992).

O risco de metástases é alto para os carcinomas indiferenciados e maiores que seis mm de espessura e conseqüentemente se infiltram na musculatura, o pericôndrio ou periósteo.Deve-se ressaltar que as recidivas também estão relacionadas com a espessura (BREUNINGER *et al.*, 1990).

Os tumores no couro cabeludo, fronte, orelhas, nariz, lábios apresentam riscos maiores de metástases (BRODLAND; ZITELLI, 1992). Sendo que os originários do lábio e orelha apresentam metástases em 10 a 20 % dos casos (HOSAL *et al.*, 1992). O CEC de lábio tem uma taxa de metástase de mais ou menos 11%, ou seja, é a maior entre os casos de Carcinoma Espinocelular da pele (MOY, 2000). O CEC quando ocorre na linha de junção entre a cavidade oral e a pele, torna os dados aferidos no câncer de pele e câncer de lábio,

geralmente, abstrusos. Isto devido à dificuldade na determinação do sítio de origem da neoplasia, podendo tanto ser cadastrados como câncer de pele como câncer de mucosa oral. (CALY *et al.*, 2007).

O CEC pode se disseminar por expansão e infiltração quando se alastra lateralmente, apresentando crescimento em prateleiras ou deslizante, ou quando o tumor atinge uma superfície rígida como músculo, cartilagem e osso. Ocorre também em áreas com pouco tecido subcutâneo como nariz, pálpebras, orelhas, lábios superiores, couro cabeludo. Já a disseminação por conduítes ocorre ao longo de um nervo ou vaso no espaço perineural ou perivascular, na cabeça e pescoço. Metastatizam primariamente através de linfáticos, inicialmente os linfonodos de drenagem superficial e depois os mais profundos. A metástase à distância, ocorre por via hematogênica, sendo os sítios mais comuns os pulmões, fígado, cérebro, pele e osso (HABIF, 2005).

No CEC, os processos de invasão e metástases são regulados por um complexo sistema, decorrente da interação entre as células neoplásicas e as células estromais hospedeiras. Tais processos ocorrem em consequência da degradação da membrana basal e da matriz extracelular por diversas enzimas, dentre as quais as metaloproteinases da matriz (MMP) apresentam destaque. Essas são enzimas zinco dependentes, pouco expressas em tecidos normais, e substancialmente, aumentadas na maioria das neoplasias malignas (PEREIRA *et al.*, 2006; RIBEIRO *et al.*, 2008).

Certas enzimas como as gelatinases desempenham papel importante, degradando o colágeno, componente da membrana basal, participando do processo de invasão do estroma e dos vasos sanguíneos, destruindo assim a membrana basal e disseminando as metástases (PEREIRA *et al.*, 2006; RIBEIRO *et al.*, 2008).

Atualmente, é aceito que a membrana basal, aquela que separa o epitélio do tecido conjuntivo, representa a primeira estrutura a ser degradada durante o processo de invasão das células epiteliais neoplásicas (PEREIRA *et al.*, 2006).

O diagnóstico diferencial clinico do CEC é feito com Ceratose Seborréica, Granuloma Piogênico, Ceratose Actínica, Ceratoacantoma, Carcinoma Basocelular, Doença de Bowen, Melanoma Amelanótico, Tumor de Merkel, tumores de anexos e sarcoma. Quando o CEC é muito indiferenciado, os diagnósticos diferenciais importantes histopatologicos são realizados com o melanoma e o sarcoma, sendo às vezes, necessário, além da histopatologia, exame imuno-histoquímico (HABIF, 2005).

O tratamento é basicamente cirúrgico, podendo se utilizar radioterapia como escolha. Dependendo da natureza, tamanho e localização do tumor, a presença ou não de metástase, e

o estado geral de saúde do paciente pode-se optar por este tratamento radioterápico (DU VIVIER, 1994; MÉLEGA, 2002). Quando se detecta comprometimento linfático deve-se realizar o esvaziamento ganglionar, seguido de radioterapia (MÉLEGA, 2002). Se o CEC é reincidente, o tratamento mais adequado é a cirurgia excisional com congelação pré operatória ou a Cirurgia Micrográfica de Mohs – CMM (MÉLEGA, 2002). Apesar de todos os cuidados com a manipulação do tumor e margens cirúrgicas adequadas, comprovadas pelo exame anátomo-patológico, ainda são frequentes as recidivas do CEC (MÉLEGA, 2002)

O parâmetro histológico que orienta a escolha do tratamento envolve o grau de diferenciação, presença de invasão perineural, invasão linfática, profundidade de invasão, espessura tumoral. Quanto à borda tumoral, se ela não for bem delimitada, é preferível o tratamento com cirurgia excisional ampla ou CMM (MÉLEGA, 2002). As técnicas de imuno-histoquímica podem ser utilizadas mais rotineiramente, visto que promovem um resultado confiável, além de ser um método de fácil execução e custo accessível. E permitem auxiliar a detecção de locais com maior predisposição à transformação maligna e servir também como fator prognóstico no curso clínico do Carcinoma Espinocelular facilitando a conduta do cirurgião (PEREIRA *et al.*, 2006).

2.2.2 **Ceratose Actínica**

A Ceratose Actínica (CA) é uma desordem epidérmica, considerada uma displasia epitelial resultante de exposição crônica à luz dos raios solares. É muito comum em indivíduos de pele clara (DU VIVIER, 1994; HABIF, 2005; KUMAR, 2005). Seu aparecimento pode estar relacionado à exposição a hidrocarbonetos, arsênicos, e a imunossupressão pode também ser um fator de risco (LEFFELL, 2000).

A CA inicia-se clinicamente como uma pequena área de vascularização aumentada ou telangectasia. São comumente vistas como lesões múltiplas em áreas expostas ao sol, tanto em adultos quanto em idosos. Usualmente, as lesões medem menos de um centímetro de diâmetro e frequentemente são recobertas por escamas aderentes e levemente palpáveis, exceto nas formas hipertróficas de apresentação (SCHWARTZ *et al.*, 2003). Localizam-se amiúde na face, braços e dorso da mão. Quando aparecem nos lábios recebem o nome de queilite actínica (ROBBINS; COTRAN, 2005; SMOLLER, 2006).

Quando as lesões deixam de ser intraepidérmicas e se estendem em profundidade, rompem a membrana basal, envolvendo a derme papilar e a reticular, tornando-se então, um CEC (COCKERELL, 2000). O potencial de mudança de comportamento não pode ser previsto por sinais clínicos ou por características histológicas. As lesões podem sofrer remissão espontânea se a exposição à luz solar for reduzida, contudo, novas lesões podem surgir. A probabilidade da CA evoluir para CEC é estimada em 0,085% por lesão/ano, por conseguinte. Destarte, o CEC desenvolver-se-ia em uma taxa de, no mínimo, 10,2% em 10 anos (DODSON *et al.*, 1991; COCKERELL, 2000). Nos quais, até 60% dos CEC evoluem a partir de CA (MARKS *et al.*, 1986; MARKS *et a*l., 1988).

Os pacientes, geralmente, percebem as lesões, pela primeira vez, durante o verão, confirmando sua faculdade após a exposição solar, período em que podem se tornar mais ativas (HABIF, 2005). As lesões também podem surgir dois a quatro anos após o transplante, em pacientes imunodeprimidos (JENSEN *et al.*, 2000).

Outras formas clínicas de apresentação incluem: corno-cutâneo, que é uma forma hipertrófica que acumula ceratina e torna-se uma protuberância hiperceratótica crônica; CA pigmentada disseminada, que lembra um lentigo descamativo e ceratose seborréica. (SCHWARTZ *et al.*, 2003; HABIF, 2005)

Os CECs que evoluem a partir das Ceratoses Actínicas não são agressivos, no entanto, podem metastatizar. Existem vários sinais clínicos que dificultam a distinção entre CA e CEC, entre os quais: aumento da espessura, vermelhidão, dor, ulceração e tamanho da lesão (SCHWARTZ *et al.*, 2003; HABIF, 2005).

Histologicamente, uma CA compreende células epiteliais anormais confinadas à epiderme. As células tem núcleos grandes pleomórficos e citoplasma acidófilo. Algumas, em mitose, mostram sinais de cornificação deficiente com células diceratóticas e paraceratose (COCKERELL, 2000; HEAPHY; ACKERMAN, 2000).

A radiação ultravioleta dá início ao processo, induzindo mutação no DNA, na maioria das vezes, no gene supressor tumoral p53 e nos queratinócitos. As células com p53 disfuncional podem, com exposição adicional à radiação, serem estimuladas a sofrer uma proliferação celular clonal descontrolada na epiderme, produzindo CA. Deste modo, uma exposição continuada à irradiação UV permite a progressão tumoral mediante a seleção de clones de células resistentes a apoptose (CABRERA MORALES *et al.*, 2006). Entretanto, nem todas as CAs levam ao CEC, mesmo em tempo prolongado de evolução (SMOLLER, 2006).

Estudos recentes têm buscado detectar alterações na expressão e metilação de genes supressores que possam estar associados à progressão da Ceratose Actinica para Carcinoma Espinocelular (ORTONNE, 2002; SCHWARTZ *et al.*, 2003).

Os pacientes portadores de CA necessitam de avaliações periódicas, sendo as medidas preventivas essenciais. Essas podem ser: filtro solar, vestimentas, óculos, e chapéus indicados. (HABIF, 2005). Algumas vezes tal ceratose sofre remissão espontânea. Os filtros solares mais indicados são aqueles combinados, que bloqueiam igualmente UVA e UVB (HABIF, 2005).

Em relação ao paciente com poucas lesões superficiais, o tratamento cirúrgico pode ser adiado. As pequenas lesões devem ser reexaminadas periodicamente por causa da remissão espontânea, sendo que os pacientes devem evitar exposição solar subsequente. Todavia, nas lesões maiores o tratamento deve ser incisivo, a fim de interromper a progressão para o CEC (SCHWARTZ *et al.*, 2003; HABIF, 2005).

Dentre as formas terapêuticas utilizadas, deve-se aludir: crioterapia com nitrogênio líquido, que causa a separação entre a epiderme e a derme; remoção cirúrgica, com ressecção a bisturi; eletro cauterização; e laser de CO2. A quimioterapia tópica com 5-FU, um agente que se incorpora às células em divisão, acaba por resultar em morte celular. No que tange às células normais adjacentes (que estão fora do ciclo celular) nota-se que, geralmente, são as menos afetadas. Outros fármacos também podem ser utilizados, a saber: Imiquimode creme a 5%, modulador da resposta imune; diclofenaco sódico a 3% e ácido hialurônico a 2,5% (HABIF, 2005; O'GRAY *et al.*, 2007).

2.3 **O Ciclo Celular: Mecanismos de regulação e proliferação celular**

O entendimento do ciclo celular e dos seus mecanismos reguladores é de suma importância para o estudo das neoplasias cutâneas. Igualmente sua biologia, diagnóstico e prognóstico. Posto que, na maioria das neoplasias, há grande percentual de células no ciclo celular (FARIA, 2002).

A proliferação celular caracteriza-se como um processo biológico importantíssimo para o organismo. Ela é definida como o aumento do número de células que tenham completado seu ciclo celular. Sabe-se que o controle desse processo é perdido nas lesões cancerosas, aparecendo a proliferação celular anormal como fator precursor na origem de tumores malignos (BROWN; GATTER, 1990).

Os genes supressores tumorais codificam proteínas que reduzem ou inibem a progressão do ciclo celular, através de fases específicas. Células tumorais em vários estágios de progressão apresentam alterações estruturais ou de expressão gênica, correlacionadas à agressividade do tumor (RABENHORST *et al.*, 1994).

O ciclo celular é uma cascata de eventos que se processam de maneira ordenada, assegurando a duplicação fiel dos componentes celulares em uma sequência lógica, seguida da divisão destes componentes em duas células filhas idênticas. Compreende 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 (RABENHORST *et al.*, 1994; AGUIAR, 1996; QUEIROZ, 1997). Quando as células estão fora do ciclo celular encontram-se na fase G0, caracterizada 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 (AGUIAR, 1996; QUEIROZ, 1997).

A duração dessas fases varia com o tipo celular e é também dependente de outras condições como idade, presença de fatores de crescimento e hormônios (RABENHORST *et al.*, 1994).

As fases G1, S e G2 compreendem 90% do tempo total do ciclo celular e caracterizam a interfase. A progressão das fases do ciclo celular é realizada pela presença de limites que agem antes do começo da fase S ou M e se concluem quando ocorre a replicação do DNA, anterior à entrada da célula na mitose. O mecanismo de controle do ciclo celular é um dispositivo bioquímico operando ciclicamente através de proteínas alvo interagindo entre si, induzindo e coordenando os processos envolvidos na divisão dos conteúdos celulares. (FARIA, 2002).

O ciclo celular apresenta seus próprios controles internos, chamados de pontos de verificação. Existem dois pontos principais: um na transição G1/S e outro G2/M. A fase S é o ponto limite no ciclo. E, antes de uma proliferação celular, o ponto de verificação em G1/ S avalia a presença de lesão de DNA. Se houver lesão de DNA, o equipamento de reparo do DNA e os mecanismos que reparam o ciclo celular entram em ação (FARIA, 2002; KUMAR, 2005).

Longe de ser visto apenas como um grupo de quatro etapas, o ciclo celular se apresenta bem mais complexo, controlado por mecanismos molecular reguladores altamente conservados, ativados e movidos em sequências organizadas (LEVINE *et al.*, 1994).

Um fator importante da regulação do ciclo é dado pelas proteínas "quinase cíclina-dependente" (CDK), cuja regulação por fosforilação é feita pelas cíclinas. As cíclinas são

proteínas de ocorrência cíclica que são ativadas e degradadas no ciclo celular. Existem basicamente duas classes de cíclinas: as mitóticas e as cíclinas G1. As mitóticas, juntamente com as CDKs, formam o fator promotor de maturação ou mitose (MPF), capazes de controlar a entrada da célula nessa fase. As cíclinas G1 são necessárias para a entrada da célula na fase S. No entanto, as proteínas CDK agem fosforilando resíduos de serina e trionina de proteínas alvo (KUMAR *et al.,* 2005). Nesses pontos de checagem, várias condições são analisadas. Como por exemplo, no ponto de controle G: o tamanho celular e a condição do meio celular (FARIA, 2002)

A progressão das células que iniciaram o ciclo é controlada por hormônios, nutrientes e fatores de crescimento. Os fatores de crescimento estimulam a célula a se proliferar através da ligação com receptores específicos. Os quais, uma vez ativados, emitem um sinal de transdução, via segundos mensageiros do citoplasma ao núcleo celular (RABENHORST *et al.,* 1994).

Os sistemas reguladores do ciclo celular, sua regulação com fatores de crescimento, oncogens, gens supressores de tumor e as proteínas envolvidas com a progressão das diversas fases do ciclo celular são objetos de estudos variados no campo da biologia tumoral. Estes estudos visam a detecção e quantificação das células em proliferação, objetivando a obtenção de uma estimativa de crescimento celular com consequente repercussão no prognóstico e tratamento dos mais variados tumores (RABENHORST *et al.,* 1993).

Os mecanismos para avaliação da cinética celular são complexos, demandam tempo e equipamentos especiais. Os primeiros trabalhos em cinética de proliferação celular eram baseados em medidas de índice mitótico e no uso de vários agentes cinéticos. No entanto, a contagem de mitoses não é fidedigna ou reproduzível, refletindo apenas parte do ciclo celular (RABENHORST *et al.,* 1993).

Contudo, a utilização de anticorpos dirigidos contra antígenos específicos expressos nas células proliferantes dos tumores, oferecem como vantagem, permitir a análise simultânea da proliferação celular e de sua histologia. Os métodos imuno-histoquímicos, que utilizam anticorpos dirigidos às proteínas do ciclo celular, são de ampla importância, podendo ser empregados a tecidos rotineiramente fixados e processados. Além do mais, permite que se mostre a distribuição espacial e até mesmo o fenótipo das células em proliferação (AGUIAR, 1996).

Na identificação das células em proliferação, algumas proteínas envolvidas com a fase replicativa do DNA tem sido utilizadas como marcadores de proliferação celular, destacando-se o PCNA e o antígeno Ki-67. A avaliação destes marcadores fornece a possibilidade de

investigação de tumores humanos de maneira simplificada, rápida e com baixo custo (RABENHORST *et al.*, 1993; RABENHORST *et al.*, 1994).

Tem-se buscado a melhoria das técnicas imuno-histoquímicas para detectar esses antígenos e as recuperações antigênicas em materiais previamente processados em parafina, além da especificidade da recuperação (KUBBUTAT, 1994).

2.4 **Oncogênese**

Qualquer gen que codifica uma proteína capaz de transformar células em cultura ou de induzir câncer em animais é chamado oncogene. Dos muitos oncogenes conhecidos, a maioria são derivados de genes celulares normais – proto-oncogenes, cujos produtos participam no controle dos processos de crescimento celular (SOEHNGE; ANANTHASWAMY, 1997).

Os oncogenes são, em geral, geneticamente dominantes, sendo que a mutação de uma cópia de proto-oncogene é suficiente para produzir o fenótipo (MARTINEZ *et al.*, 2006).

A transformação de uma célula normal em célula maligna envolve um processo relacionado ao dano do genoma. Existem quatro tipos de genes envolvidos na patogênese do câncer: os oncogenes, os genes supressores de tumor, os genes relacionados a apoptose e os genes de reparo do DNA. A proliferação de uma célula tumoral envolve dois mecanismos básicos que são: 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 de fatores de crescimento, proteínas sinalizadoras, fatores transcripcionais nucleares e cíclinas cinases dependentes (FARIA, 2002).

As células normais necessitam, para a proliferação celular, 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 ά de crescimento de tumor (TGF-ά) e o fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF). As células neoplásicas providenciam mecanismos que permitem a ativação constante dos fatores de crescimento, o que resulta em estímulo mitogênico continuado (FARIA, 2002).

Os oncogenes ativam fatores de transcrição como a cíclina D, para que ocorra a fosforilação do produto do gene retinoblastoma (pRb) e assim, por conseguinte, inicie 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 a ativação inadequada de oncogenes, o controle da observação de quebra nas fitas de DNA, e a insuficiência de nucleotídeos para síntese de DNA. A ativação da p53, como fator de muitos genes envolvidos no reparo do DNA, induz a parada em G1 e apoptose. O valor do papel desempenhado pelo p53 fica evidenciada pelo fato de que mais de 70% das neoplasias malignas do ser humano apresentam alterações deste gene (FARIA, 2002).

Tem-se procurado avaliar a expressão de alguns oncogenes com a finalidade de entender melhor os eventos subcelulares associados a oncogenese e suas correlações com o comportamento biológico de diversos tumores. A compreensão dos mecanismos que promovem instabilidade genômica, como ganhos ou perdas de sequências e translocacão cromossômica, pode num futuro próximo, não só auxiliar no estadiamento tumoral como também no estabelecimento de novas terapias, que irão beneficiar milhares de portadores de tumores diagnosticados anualmente em todo o mundo. (MARTINEZ *et al.*, 2006).

2.5 **Apoptose**

O termo apoptose foi introduzido para caracterizar a morte celular programada. O patologista australiano Kerr *et al.* (1972) observando células morrendo em diversas condições patológicas ou não, verificaram que elas partilhavam de uma morfologia estereotipada, aplicando a este fenômeno o termo apoptose, que do grego "apo", significa para longe e "ptosis": queda, palavra usada por poetas gregos para descrever flores ou folhas cadentes (KERR *et al.*, 1972).

Nos últimos vinte anos, o estudo da apoptose vem sendo intensificado devido sua importância na determinação dos mecanismos patogênicos das doenças hematológicas e neoplasias malignas. Sua regulação envolve uma linha complexa de proteínas supressoras e efetoras - atuando em diversas vias - e o balanço entre esses elementos, o que levará a destruição celular, ou a resistência à morte celular programada (LO MUZIO *et a*l., 2001; FARIA, 2002; JACKSON *et al.*, 2002;).

Alterações bioquímicas e morfológicas da apoptose já foram bem definidas por estudos utilizando microscopia eletrônica. 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 (LO MUZIO *et al.*, 2001; KUMAR *et al.*, 2005).

Basicamente duas vias podem induzir a célula à apoptose. A via interna, relacionada principalmente à atividade mitocondrial e à liberação do citocromo c, e a via externa, desencadeada pelo estímulo de receptores na superfície da membrana celular (FARIA, 2002; KUMAR *et al.*, 2005).

Vários receptores de membrana foram identificados como sinalizadores de morte celular. Entre eles a família Fas (CD95) e fator de necrose tumoral receptor do tipo um (1) (TNFR1), que é mais proeminente. Esses receptores podem ser ativados por ligação cruzada do "Fasligand" (Faz-Fasl), levando à trimerização, como o agrupamento da molécula adaptadora "Fas-associeted Death Domain" (FAAD). A procaspase-8 é então ativada por oligomerização e autoclivagem, levando à ativação sequencial à jusante das caspases efetoras (FARIA, 2002; KUMAR *et al.*, 2005).

As caspases podem também ser ativadas por via mitocondrial, cujo 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 (FARIA, 2002; KUMAR *et al.*, 2005).

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 subsequente da caspase-3, caspase-6 e caspase-7 (FARIA, 2002; KUMAR *et al.*, 2005).

Células apoptóticas podem ser identificadas em lâminas coradas pela técnica da hematoxilina e eosina ao microscópio óptico. As características observadas são compatíveis com a fase tardia da apoptose, quando o citoplasma apresenta-se eosinofílico, a cromatina se condensa na membrana nuclear e há formação de corpos apoptóticos. No entanto, a sua ocorrência em células isoladas e seu discreto aparecimento e resolução dificulta sua detecção, consumindo mais tempo, além de necessitar de um observador capacitado (BALASSIANO, 2004).

Nos últimos tempos foi descoberto um mecanismo de interação entre a via extrínseca e a via mitocondrial de ativação das caspases. Tal mecanismo promove a ativação do Bax,

levando à liberação de citocromo c pela mitocôndria e ativação da procaspase-9 (FARIA, 2002).

A regulação da apoptose mostra-se importante para o desenvolvimento e manutenção dos tecidos normais. Os distúrbios apoptóticos, considerados o primeiro evento em alguns tipos de câncer e leucemia, permitem que células malignas tenham maior sobrevida, o que contribui para que ocorra a expansão neoplásica (BALASSIANO, 2004).

2.6 **Marcadores Tumorais**

Na busca 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 imuno-histoquímicos de proliferação celular, aplicados à patologia das neoplasias, permite a compreensão das alterações morfológicas ocorridas no processo de transformação neoplásica (MONTESANO *et al.*, 1997).

Um indicador da carcinogênese precoce é o aumento da atividade proliferativa do tecido transformado. Em virtude dos avanços obtidos nos métodos de estudo da proliferação celular e do 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 imuno-histoquímicos (AGUIAR, 1996).

Assim torna-se evidente a preocupação de diversos autores na busca de marcadores biológicos que, junto aos parâmetros clínicos e histológicos, auxiliem o estabelecimento do diagnóstico, prognóstico e tratamento dos tumores (MONTESANO *et al.*, 1997). Os dois marcadores imuno-histoquímicos mais usados para estudar a proliferação celular são o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) e o antígeno Ki-67. Para o estudo da apoptose são o Bcl-2 e p53 (BALASSIANO, 2004).

A literatura pesquisada sugere que a expressão de um ou mais genes supressores tumorais tem se mostrado alterada na progressão de ceratose actinica (CA) para Carcinoma Espinocelular (CEC). Sendo assim, fica clara a importancia da verificação da expressão dos marcadores tumorais nessas patologias.

2.6.1 **p53**

A identificação da proteína p53 foi uma consequência direta da estabilização dessa proteína pelo antígeno T do vírus SV-40. O gene p53 normal atua como gene supressor tumoral. E a proteína selvagem atua inibindo a proliferação celular e a transformação (LEVINE *et al.,* 1991).

Localizado no braço curto do cromossomo 17p, esse gene codifica uma fosfoproteína nuclear de peso 53 KDa, que regula a proliferação e a morte celular. Durante muito tempo, a proteína foi conhecida como um oncogene, depois foi descoberta a sua relação com o controle da proliferação celular, inibição do crescimento e da transformação neoplásica. 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 (BIOSCIENCE, 2005).

A p53 quando em forma mutada apresenta uma meia vida de 6 horas e pode ser detectada pela técnica de imuno-histoquímica. Já a forma selvagem tem meia vida muito curta, com cerca de 6 a 20 minutos (LEVINE *et al.*, 1992).

Nas neoplasias humanas, as mutações da proteína p53 são muito comuns, chegando a atingir 50% dos cânceres humanos. Uma grande frequência de mutações na p53 é verificada no Carcinoma Espinocelular (CEC) de boca, podendo exercer um papel importante nos estágios iniciais de cânceres de cabeça e pescoço, estando sua presença nos estágios finais associada com prognóstico ruim (CALY *et al.,* 2007).

A p53 funciona como uma proteína guardiã do genoma, impedindo, portanto, que células que sofreram mutações proliferem. Além do mais, atua como um policial molecular quando o DNA é danificado. Isso ocorrido, nota-se o aumento da produção de p53, que se acumula na célula e paralisa o ciclo celular em G1, dando tempo para o reparo do DNA. Se esse reparo não é possível, a p53 dispara então a apoptose (LEVINE *et al.,* 1994;AGUIAR, 1996; PARK *et al.,* 2004; STRATIGOS *et al.,* 2005).

Normalmente, a proteína p53 se liga ao DNA podendo ativar ou suprimir determinados genes. Um gene que pode ser ativado pela p53 é o WAF1/CIP1, cujo produto proteico codificado é uma proteína chamada p21 que se liga e inibe a atuação da cíclina/CDK, paralisando o ciclo celular antes que a célula seja ordenada a se dividir, propiciando tempo para que o reparo do DNA se processe (AGUIAR, 1996).

As mutações do p53 são consideradas a alteração genética mais comum no câncer humano (LEVINE *et al.*, 1991;CAVALCANTE JR *et al.*, 2003). A proteína p53 é altamente conservada durante o processo de evolução, sendo identificada em várias espécies. A comparação da sequência de aminoácidos de todas as proteínas p53 revela cinco blocos de sequências conservadas. E esses blocos são os locais mais afetados pelas mutações (LEVINE *et al.*, 1994).

Foi demonstrado que a deficiência no mecanismo da apoptose pode predispor o indivíduo a ter câncer de pele. Tal capacidade do p53, provavelmente, dá-se 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 (LEVINE *et al.*, 1994).

Se por um lado o significado das alterações do p53 no prognóstico do câncer não se configure claro em plenitude, por outro, elas nos permitem predizer o risco de malignidade 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, 2004).

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 sendo este o mecanismo pelo qual a função do gene é efetuada. (CHANG *et al.*, 1998; SHIMIZU *et al.*, 1999).

A identificação imuno-histoquímica 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 prémalignidade (BATINAC *et al.*, 2004, HO KIM *et al.*, 2006).

A imunorreatividade para p53 também tem sido observada no epitélio hiperplásico adjacente ao tumor. Rabenhorst (1994) observou a imunorreatividade do p53 no epitélio hiperplásico adjacente ao tumor cutâneo e Campbell *et al.* (1993) já haviam mostrado esta imunorreatividade em queratinócitos aparentemente normais nas margens de carcinoma "in situ" de pele, sugerindo que isso poderia 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, mostram que a mutação do p53 causada pela radiação ultravioleta pode indicar transformação maligna precoce e indicar o grau de malignidade estudada por vários autores (HELANDER *et al.*, 1993; NAGANO *et al.*, 1993;

KERSCHUMANN *et al.*, 1994; WIKONKAL *et al.,* 1997; BATINAC, 2004; STRATIGOS *et al.,*2005; GAITONDE; RONAI, 2007).

Estudos realizados imuno-histoquimicamente no uso da proteína p53 em lesões bucais e potencialmente malignas observaram positividade para p53, sendo que nenhuma das queratoses ou hiperplasias sem atipia ou amostras de tecido normal apresentou positividade para p53 (AGUIAR, 1996).

Buscando verificar em que momento da tumorigene as alterações da p53 poderiam ser detectadas foi estudada a expressão imuno-histoquímica da p53 em carcinomas de cabeça e pescoço, que apresentavam epitélio adjacente ao tumor, histologicamente normal, hiperplásico, ou atípico. Os achados mostraram tal expressão em 45% dos carcinomas. Foi encontrado aumento progressivo na expressão da p53 à medida que os tecidos progrediram para a malignidade, não só em relação ao número de células marcadas e intensidade da reação, mas também analogamente a reação às camadas parabasais (AGUIAR, 1996).

A detecção da p53 vem sendo demonstrada como um bom marcador imuno-histoquímico em eventos iniciais da carcinogenese da cabeça e pescoço e até em locais onde não se identificam alterações histopatológicas. Estudos mostraram positividade para proteína p53 em epitélios com significativa distância do sítio primário do tumor e em lesões pré malignas (AGUIAR, 1996; STRATIGOS *et al.,* 2005).

2.6.2 **PCNA**

O antígeno nuclear de células proliferativas (PCNA) foi descrito a partir do soro de 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. O antígeno é um marcador de proliferação celular deveras útil no estudo do comportamento biológico de muitos tumores (BRAVO *et al.*, 1987; RABENHORST *et al.,* 1993).

O seu aparecimento periódico, ao longo do ciclo celular, fez com que ele fosse designado PCNA/cíclina, embora não guarde nenhuma homologia com as clássicas cíclinas do ciclo (KURSKI *et a*l., 1986).

Estudos mostraram a existência de duas populações de PCNA durante a fase S do ciclo celular. Uma, a nucleoplasmática, está presente em células quiescentes e é facilmente

extraída por detergentes. A outra está associada a sítios de replicação do DNA e não pode ser extraída com solventes orgânicos (BRAVO, 1987).

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 imuno-histoquímica do antígeno PCNA, o que pode propiciar coloração de fundo e gerar alguns problemas na quantificação da marcação. Todavia, 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).

Uma grande variedade de anticorpos que reconhecem o PCNA encontra-se disponível, atualmente. Eles vão desde o soro de pacientes com lupus eritematoso sistêmico e outras doenças autoimunes até anticorpos monoclonais PC10, 19 A2 e 19F4. Estes anticorpos monoclonais reagem com epítopos antigênicos resistentes à fixação em formalina, o que facilita o seu uso em materiais colhidos rotineiramente (RABENHORST *et al.,* 1994). Deste modo, a grande disponibilidade comercial de anticorpos monoclonais antiPCNA, com capacidade de reagir com epítopos antigênicos resistentes à fixação, facilita consideravelmente o seu emprego em materiais colhidos em rotina ou de arquivos, o que lhe confere vantagens sobre um outro marcador, o Ki-67, em estudos clínicos e experimentais (RABENHORST *et al.,* 1993; LU *et al.*, 1999).

Comparando a imuno-histoquímica para PCNA com diversos métodos para análise de proliferação celular em uma amostra constituída de Carcinomas Epidermoides (CEC), leucoplasias e epitélio bucal normal, concluíram que a imuno-histoquímica para PCNA é o método mais fácil e confiável na detecção de células proliferantes quando comparado aos outros marcadores de proliferação celular (AGUIAR,1996, ARISAWA *et al.*,1999; BALASSIANO, 2004).

A expressão do PCNA avaliada por tais métodos está correlacionada a atividades mitóticas, gradação histológica e comportamento clínico de alguns tumores. O que a torna muito útil no estudo dos tumores cutâneos (LU *et al.,* 1999).

O PCNA pode ser uma boa alternativa para o estudo da proliferação celular em materiais emblocados em parafina, permitindo a identificação de compartimentos de proliferação dentro dos tumores. Além disso, a imunorreatividade do PCNA tem mostrado correlação ao prognóstico de tumores e é notoriamente útil em casos de difícil previsão do curso clínico a partir do quadro histológico (TOTH *et al.,* 1996; LU *et al.,* 1999).

Uma diferença significativa é observada entre os índices de PCNA nas lesões cutâneas benignas como as leucoplasias, e nas malignas tais quais carcinomas, bem como, demonstra-se perceptível a redução significante nos índices de PCNA nos carcinomas após quimioterapia. Ocorrência que levou alguns autores a concluírem que a resposta das neoplasias aos agentes quimioterápicos pode ser estimada através de medidas consecutivas do PCNA (TOTH *et al.*, 1996; LU *et al.*, 1999). Foi identificada também uma forte correlação entre atipia e a expressão suprabasal do PCNA (HUANG *et al.*, 1994).

Quando a radiação ultravioleta induz a carcinogênese cutânea, observa-se que a expressão do PCNA em queratinócitos de pele exposta ao sol é maior na camada suprabasal do que na basal e está associada à progressão para câncer de pele. No epitélio normal e nas lesões hiperplásicas, o PCNA tem expressividade apenas na camada basal, enquanto na expressão suprabasal foi observada em todas as displasias, carcinomas "in situ" e invasivos (AGUIAR, 1996).

Verificou-se que a expressão do PCNA no epitélio normal é observada apenas na camada basal. Porém, no epitélio normal, localizado próximo aos carcinomas de cabeça e pescoço, a expressão do PCNA tem sido relatada tanto na camada basal quanto na parabasal do epitélio. Alguns autores tem relatado a expressão da PCNA no epitélio normal e uma forte correlação entre atipia e a expressão suprabasal do PCNA (TSUJI *et al.*, 1992; SHIN *et al.*, 1993;HUANG *et al.*, 1994).

A expressão do PCNA avaliada por imuno-histoquímica está correlacionada à atividade mitótica, à gradação histológica e ao comportamento clínico de alguns tumores. 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 (QUEIROZ, 1997).

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

Fatores técnicos como processamento, tempo de fixação e tipo de fixador podem influenciar a expressão do PCNA, que se torna reduzida após um período de 48h. Considerando o fato de que os anticorpos reagem com epítopos antigênicos resistentes à fixação em formol, o seu uso em material de arquivo é praticável (RABENHORST *et al.*, 1994).

Com o objetivo de encontrar um marcador para as fases iniciais de desenvolvimento do câncer, foi estudada a expressão de PCNA em Carcinomas Espinocelular de cabeça e pescoço e no epitélio adjacente. Os autores observaram aumento na expressão da PCNA na medida em que os tecidos progrediram de epitélio normal para hiperplásico, de hiperplasia para atipia e de atipia para CEC. Concluíram, enfim, que o PCNA pode ser um biomarcador útil para os múltiplos passos da carcinogênese e sugeriram a utilização do PCNA em triagens quimio preventivas (AGUIAR, 1996).

2.6.3 **Ki-67**

O anticorpo monoclonal ki-67 foi assim designado por ter sido produzido na Universidade de Kiel, Alemanha, sendo o clone produtor detectado na 67ª placa de cultura de tecido (BROWN; GATTER, 1990). A natureza molecular do antígeno identificado pelo Ki-67 permanece desconhecida. Sabe-se que corresponde ao produto de uma sequência gênica que codifica uma proteína não-histônica de peso molecular aparente de 345-395 KDa (RABENHORST *et al.*, 1993; AGUIAR, 1996).

Gerdes *et al.* (1983) produziram o anticorpo monoclonal inicialmente contra a linhagem de células de Hodgkin e Reed-Staenberg. No entanto, observaram a identificação de um antígeno nuclear presente nas células em proliferação dos tecidos estudados, assim como nas células tumorais de algumas neoplasias malignas selecionadas. Em contraste, essa marcação não foi observada em células normais no estágio de latência. Concluíram, de tal modo, que a identificação do Ki-67 tornar-se-ia uma valiosa ferramenta para uma segura e rápida determinação do índice de proliferação das neoplasias malignas, pois que o percentual de células em proliferação representa grande valor prognóstico, além de dar ao paciente portador da patologia a chance de receber o tratamento adequado.

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 (GERDES *et al.*, 1983).

As taxas de avaliação do índice de proliferação celular, usando anticorpos monoclonais anti-Ki-67 encontrados comercialmente, são compatíveis com aquelas dos métodos tradicionais. Alguns estudos tem 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 hidroxiureia, diminui o nível antigênico deste marcador e células com carência nutricional (que não são incomuns nos tumores) podem ter imunorreatividade discrepante em relação a outros parâmetros de proliferação celular (RABENHORST *et al.*, 1994).

A imunopositividade para o Ki-67 aparece localizada no núcleo ou em regiões perinucleares (BALASSIANO, 2004).

A vida média do Ki-67 e de menos de 1 hora, sendo que o cromossoma 10 parece estar envolvido na expressão da proteína que apresenta íntima associação com o ciclo celular (AGUIAR, 1996). De tal fato provem a limitação do emprego do Ki-67 monoclonal na rotina laboratorial, sendo necessários tecidos a fresco ou congelados, já que o epítopo reconhecido por ele é destruído pela fixação, impossibilitando assim a sua utilização em material emblocado em parafina. Conquanto, 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, equiparando os resultados aos obtidos com o Ki67 próprio para tecidos congelados (KUBBUTAT *et al.*, 1994; ROSE *et al.*, 1994). Recomenda-se o anti-Ki-67 policlonal em tecidos normais e neoplásicos fixados e processados comumente (ROSE *et al.*, 1994).

Avaliações mostram a frequência de células Ki-67 positivas em glândulas salivares normais e em tumores benignos e malignos, observando-se maior positividade nos tumores malignos (MURAKAMI *et al.*, 1992)

Em estudos de Carcinomas Espinocelulares de cabeça e pescoço indiferenciados, os índices de Ki-67 aumentaram e os tumores apresentaram variação menor da atividade proliferativa. Observou-se que quão maior o grau de diferenciação dos Carcinomas Espinocelulares de cabeça e pescoço, menor a expressão do Ki-67 (LORZ *et al.* 1994).

Estudos comprovam que a imuno-histoquímica 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 (SKALOVA, 1994).

2.6.4 **Bcl- 2**

Bcl-2 refere-se a uma família de genes dos mamíferos e as proteínas a que estes genes dão origem. Estas regulam a permeabilidade da membrana externa da mitocôndria e podem ser proapoptóticas e antiapoptóticas. O nome Bcl-2 deriva do inglês "B-cell lymphoma 2", "linfoma de células B 2", dado ser o segundo membro de um conjunto de proteínas inicialmente descritas como uma translocação genética recíproca no cromossomo 14 e 18 em linfomas foliculares. 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 a imortalização (SOUZA, 2004).

A família Bcl-2 desperta interesse, posto que tal proteína apresenta membros antiapoptóticos e proapoptóticos e a inibição da apoptose pode decorrer da falha de balanço adequado entre as duas forças (FARIA, 2002).

A princípio, 20 proteínas da família Bcl-2 já foram identificadas, apresentando características proapoptóticas ou antiapoptóticas. O gene Bcl-2 codifica uma proteína envolvida no processo de controle da apoptose. Inicialmente, descrito em linfomas e, posteriormente, em tecidos epiteliais, sua expressão é frequentemente encontrada em carcinomas de mama, associada a fatores de prognóstico favorável (FARIA, 2002).

Tilli *et al.* (2005) relatam que esta proteína está associada às membranas da mitocôndria, retículo endoplasmático e núcleos, e carrega sete locais de fosforilação, dos quais ser-70 (loccus cromossomial) é crítico para a função de supressão da apoptose, exercida pelo Bcl-2. Um grande número de proteínas relacionadas a Bcl-2 tem sido isoladas, 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.

A expressão da Bcl-2 é referida na literatura como citoplasmática, contudo, Papadimitriu *et al.* (1996), descreveram ser possível também a expressão nuclear da proteína mais em tumores malignos que em condições reacionais ou pré maliguinas. Isso devido a associação da proteína com cromossomos de núcleos em mitose de células epiteliais nas quais, provavelmente, exerce proteção do DNA contra endonucleases.

Estudos sobre a expressão do Bcl-2 na pele normal e em câncer cutâneo não melanoma concluíram que existe possibilidade da 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 (RODRIGUES-VILLANUEVA *et al.*, 1995;CHANG *et al.*, 1998).

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

A Bcl-2 aumenta consideravelmente a sobrevida das células, facilitando permanentemente mutações e transformações malignas. Estudos relataram a possibilidade de a hiperexpressão da Bcl-2 aumentar a resistência da célula à apoptose, tornando-a menos susceptíveis ao tratamento. E também observaram mutações do Bcl-2 em 17% dos cânceres cutâneo-mucosos estudados. Não se achou, porém, correlação estatística significante entre a presença da Bcl-2 e o sexo dos pacientes, tamanho do tumor ou ocorrência de metástases regionais (SOUZA *et al.*, 2004).

Huang *et al.* (2000) concluíram que as proteínas da família Bcl-2 são a chave reguladora da apoptose e objetivo atrativo para desenvolver uma nova geração de terapêutica para tratamento do câncer.

3 OBJETIVOS

São objetivos da pesquisa

a) Objetivo geral

- Avaliar a expressão de marcadores de proliferação celular e apoptose no Carcinoma Epidermóide e na Ceratose Actínica.

b) Objetivos específicos

- Avaliar a expressão dos marcadores p53, PCNA , Ki-67 e Bcl-2 através da imuno-histoquímica em amostras histológicas de pacientes portadores de CEC e CA,

- Comparar a expressão dos marcadores em amostras histológicas de pacientes portadores de CEC e Ceratose Actínica e os controles negativos,

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Amostras

Nesse estudo foram incluídos pacientes submetidos à cirurgia reparadora no período de Agosto de 2000 a Julho de 2008, na Clínica Plastic Center, nos quais o diagnóstico histopatológico foi de CEC e CA. As lâminas diagnósticas foram reavaliadas e selecionadas. As amostras cujo bloco de parafina permitisse múltiplos níveis, com adequada representação da lesão, boa qualidade de preservação do material para realização de imuno-histoquímica foram selecionadas.Dos casos que preencheram os critérios e nos que os pacientes autorizaram a utilização dos mesmos foram resgatados o prontuário para colher dados para um quadro de identificação com genero, idade, tamanho e localização da lesão.

Foram estudadas amostras de trinta pacientes, dentre eles dez com diagnóstico histopatológico de Carcinoma Espinocelular, dez com Ceratose Actínica, e dez amostras de pele de pálpebras superiores livres de lesões, provenientes de cirurgia estética das pálpebras, a blefaroplastia. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Juiz de Fora – UFJF – com o parecer nº 273/2005, datado de 15 de Dezembro de 2005.

4.2 Histopatologia

As amostras de pele obtidas durante o procedimento cirúrgico foram fixadas em formol a 10% e, posteriormente, submetidas ao processamento histológico de rotina. O material emblocado em parafina foi então submetido a microtomia, obtendo-se cortes com espessura de três micras. Estendidos em lâminas de vidro, os cortes foram corados pelo método de Hematoxilina e Eosina (H / E) e submetidos a estudo morfológico em microscopia de luz para diagnóstico anátomo patológico.

4.3 Imuno-histoquímica

A expressão dos marcadores p53, PCNA, Ki-67, Bcl-2 foi investigada nos cortes histológicos de amostras de peles, fixadas em formol 10% e emblocadas em parafina, utilizando o método streptoavidina-biotina peroxidase que inclui as seguintes etapas (VASSALO, 2001): Inicialmente foi realizada a desparafinização em xilol por 10 minutos e rehidratação em álcool a 100%, 90%, 80% e 70%. Em seguida foi feito o bloqueio da peroxidase endógena em H_2O_2 a 3% (20 min) e a recuperação antigênica em tampão citrato pH 6.0, em alta temperatura, utilizando forno micro-ondas em potência máxima de 700 W, em 2 ciclos de 9 minutos. O material após passagem pelo forno de micro-ondas, foi deixado em temperatura ambiente até atingir o equilíbrio térmico com o meio ambiente. Posteriormente, foi feita a incubação com os anticorpos primários monoclonal (Biocare Medical), anti-Bcl-2, anti-p53, anti-Ki-67 e PCNA, sendo os três primeiros nas diluições de 1:100 e o último 1:200, a 4° C (18 horas). (Quadro 1) Depois de realizada essa etapa foi feita a incubação com o anticorpo secundário biotinilado (Sistema de Detecção Universal HRP – Polymer Kit - Mach 4 TM) em temperatura ambiente por 30 minutos e logo depois uma nova incubação com reagente estrepto-avidina também por 30 minutos. A revelação foi feita utilizando substrato cromógeno 3,3-diaminobenzidine-DAB (Biocare Medical), por 5 minutos. Foi feita contracoloração com hematoxilina de Harris por 1 minuto e lavagem em água destilada, Após isso, foi feita uma desidratação em série crescente de álcool e montagem da lâmina com Entellan (Merck) e lamínula.

Foram utilizados 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.

Antes da realização das reações com os cortes histológicos do presente trabalho, foram efetuados testes com todos os marcadores em lâminas dos tumores semelhantes às estudadas para definição da melhor recuperação antigênica sobre o uso de panela de pressão ou forno de micro-ondas, a necessidade do uso de inibidor de ligações inespecificas, e a diluição do anticorpo primário, preconizado pelo laboratório fabricante, tempo de revelação para o DAB.

Quadro 1: Anticorpos primários utilizados na Reação de Imuno-histoquímica

Anticorpo	Clone	Diluição	Tempo Incubação
Bcl-2*	100 / D5	1:100	18 horas
p53*	DO-7	1:100	18 horas
Ki-67*	DVB-2	1:100	18 horas
PCNA*	PC-10	1:200	18 horas

*BIOCARE MEDICAL

4.4 Tratamento estatístico

Em virtude das variáveis consideradas neste trabalho serem de nível ordinal, foram empregados testes não-paramétricos para análise das diferenças. Para testar a diferença dos valores médios da mesma proteína, entre os dois diagnósticos, foi aplicado o teste de Mann-Whitney.

Para diferenciação entre os valores médios dentre todas as proteínas para um mesmo diagnóstico, foi aplicado o teste de Friedman e em seguida, para cada par de proteínas foi usado o teste de Wilcoxon.

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação do perfil histopatológico

As amostras de CA (FIG 1 a, b,c) e CEC (FIG 2 a, b, c) coradas pelo método de rotina Hematoxilina Eosina (HE) foram analisadas à Microscopia Óptica, utilizando microscópio Olympus, modelo BX40. E os achados descritos, conforme os aspectos histopatológicos encontrados nos dois tipos de tumor.

a b c

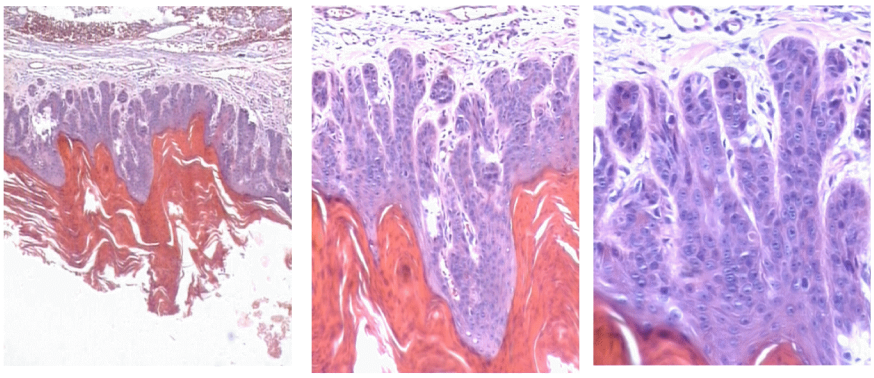


Figura 1 - Pele do dorso (caso oito), Ceratose Actínica, mostrando espessa camada ortoceratótica, acantose irregular, com brotamentos múltiplos. Na porção inferior do epitélio nota-se ceratinócitos volumosos, hipercromáticos. A membrana basal está íntegra.
HE (a, b e c) Aumentos em 100X, 200X e 400X respectivamente

DORNELAS, M. T., 2009

a b c

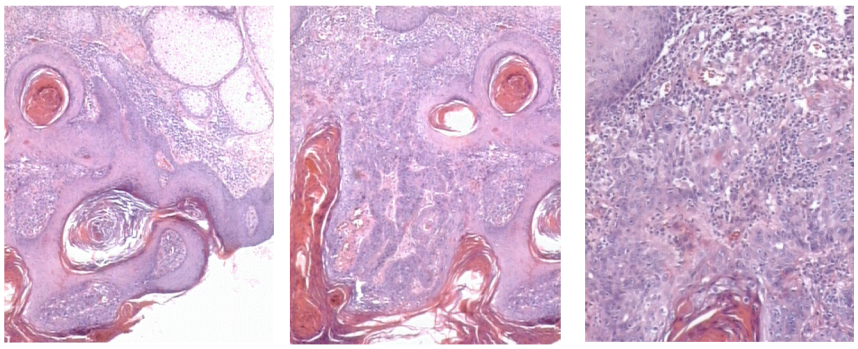


Figura 2 - Pele de região supra-clavicular esquerda (caso20), mostrando CEC bem diferenciado, caracterizado por hiperceratose, acantose irregular formada por ceratinócitos atípicos que rompem a basal e invadem o derma. No derma há discreto infiltrado linfocitário em torno dos maciços neoplásicos.
HE (a, b e c) Aumentos em 100X, 200X e 400X respectivamente

DORNELAS, M. T., 2009

O grupo controle negativo, aquele que é composto por indivíduos com pele de pálpebras resultante de blefaroplastia e livre de CEC e CA, apresenta alterações decorrentes do envelhecimento e exposição solar, ou seja, atrofia e elastose solar, sem atipias epiteliais, uma vez que esses pacientes, em sua grande maioria, eram idosos (FIG 3 a b, c).

a b c

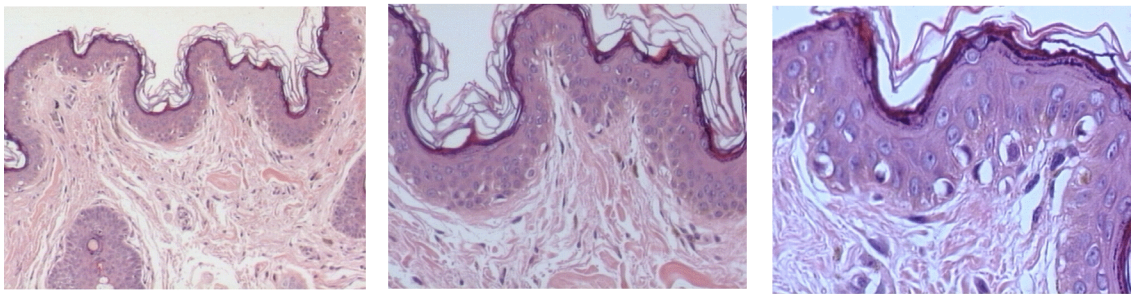


Figura 3 -Pele da pálpebra, mostrando discreta atrofia, elastose solar e ausência de atipia epitelial
HE (a, b e c) Aumentos em 100X, 200X e 400X respectivamente
DORNELAS, M. T., 2009

5.2 Avaliação dos marcadores por imuno-histoquímica

Foram testados, em todos os pacientes, os marcadores de apoptose (p53, Bcl-2) e de proliferação celular (Ki-67 e PCNA).

Em face da baixa positividade de alguns marcadores, optou-se pela análise descritiva da expressão de todos os marcadores, usando o critério de cruzes (SANNINO *et al.*, 1994).

O perfil imuno-histoquímico das lesões foi considerado como positivo quando as células apresentavam coloração acastanhada estritamente nuclear para os marcadores p53, PCNA e Ki-67. Para o Bcl-2, foi considerada positiva a marcação citoplasmática.

O critério de cruzes proposto por Sannino e Shousha (1994), leva em conta a intensidade da coloração e o número de células coradas. A intensidade de coloração foi classificada em leve, moderada e forte. Quanto ao número de células coradas, consideraram-se negativo os casos em que não se observaram células coradas; positivo, marcando uma cruz (+) quando da presença de ocasionais células positivas, duas cruzes (++) nos casos com até 1/3 coradas de moderada intensidade, três cruzes (+++) nos com até 2/3 coradas de moderada e forte intensidade ou ainda moderada intensidade em mais que 2/3 e quatro cruzes (++++) nos que

apresentaram coloração de forte intensidade em mais de 2/3 das células. A quantificação da expressão dos marcadores foi realizada pela observação de três campos microscópicos com aumento de 100x.

A distribuição dos casos estudados quanto ao gênero, idade, localização, dimensão, diagnóstico, em relação aos marcadores imuno-histoquímicos, encontra-se na Tabela 1.

Tabela 1: Características gerais dos casos quanto ao gênero, idade, localização, dimensão, diagnóstico em relação aos marcadores Imuno-histoquímicos.

Caso	Gênero	Idade	Localização (*)	Dimensão (cm)	DIAG	PCNA[1]	Ki67[2]	p53[3]	Bcl2[4]
1	M	44	Nariz	1,8 X 0,7	CA	4 +	1+	4+	1+
2	M	77	Dorso Mão E	0,6 X 0,3	CA	4+	3+	4+	1+
3	F	71	Dorso Nasal	0,5 X 0,3	CA	4+	1+	4+	1+
4	F	92	Temporo-frontal	2,3 x 0,9	CA	4+	1+	2+	0
5	F	60	Dorso Nasal E	0,8 x 0,5	CA	3+	2+	3+	0
6	M	62	Braço D	0,6 X 0,4	CA	3+	0	4+	1+
7	F	78	Região de Glabela D	0,4 X 0,3	CA	3+	2+	4+	2+
8	F	81	Dorso	1,2 x 0,7	CA	4+	3+	3+	0
9	F	75	Pálpebra D	0,5 x 0,2	CA	4+	0	3+	2+
10	M	59	Antebraço D	0,4 de diâm.	CA	4+	3+	3+	0
11	M	59	Clavicular E	0,1x 0,1	CEC	4+	1+	4+	0
12	F	44	Mandíbula E	0,6 X 0,3	CEC	4+	0	2+	0
13	M	75	Hemiface D	0,6 x 0,3	CEC	4+	2+	1+	0
14	M	87	Temporal	1,2 de diâm.	CEC	4+	2+	2+	0
15	M	88	Couro Cabeludo	0,9 x 0,5	CEC	4+	2+	2+	0
16	F	44	Lábio Superior D	0,8 x 0,4	CEC	3+	2+	2+	0
17	M	88	Torácica D	3,0 x 1,5	CEC	2+	0	1+	0
18	F	81	Cervical D	1,3 x 0,7	CEC	4+	3+	4+	0
19	F	86	Mão D	3,5 x 1,0	CEC	4+	1+	4+	0
20	M	60	Supraclavicular E	3,6 x 2,5	CEC	4+	4+	4+	0

Fonte: DORNELAS, M. T., 2009
Nota: D - direito; E – Esquerdo; CA Ceratose Actínica; CEC Carcinoma Espinocelular

A expressão do p53 foi evidenciada em todos os casos de CA. Apresentaram forte intensidade verificando (4+) cinco casos, e (3+) foi averiguado em quatro. Apenas um dos casos apresentou (2+).

Quanto ao CEC, em quatro casos verificou-se intensidade expressa em (4+) e outros quatro com (2+), sendo constatados apenas dois casos com (1+).

As amostras dos portadores de CEC não expressaram o marcador Bcl-2 e, em seis amostras de CA tal expressão foi fraca, variando de (1 a 2+) e, nas demais foi negativa.

Das amostras, em 19, o marcador de proliferação celular, PCNA, foi expresso com grande intensidade (3 a 4+). Apenas um caso apresentou marcação fraca (2+).

Em relação ao marcador Ki-67 (proliferação celular) há grande variabilidade na intensidade de marcação. Duas amostras de CA (casos 6 e 9) e duas de CEC (casos 12 e 17) não expressaram o Ki67.

A figura 4 mostra o valor médio observado para cada marcador em função do diagnóstico. Os valores mais elevados foram observados para o PCNA (3,7), para ambos diagnósticos. Em seguida, aparece o marcador p53, com valores médios de 3,4 e 2,6 para os diagnósticos CA e CEC respectivamente. Os marcadores com pontuações mais baixas foram: Ki-67 (1,6 para CA e 1,7 para CEC) e Bcl-2 (0,8 para CA e 0,0 para CEC).

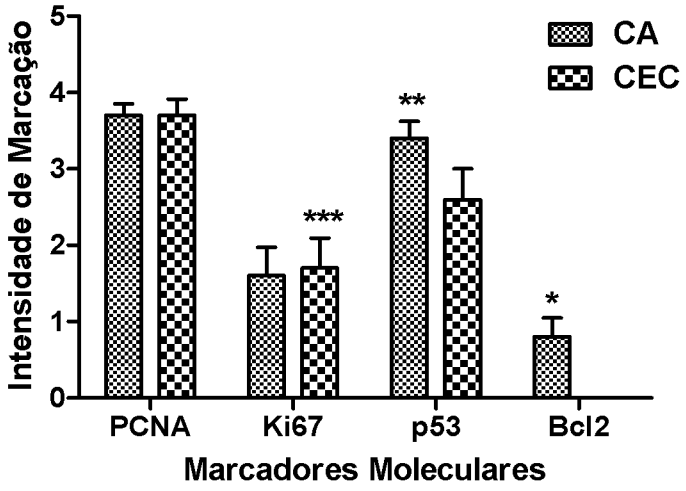
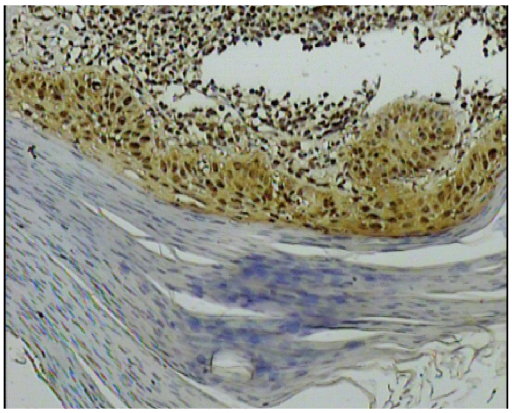


Figura 4: Intensidade da expressão dos Marcadores Moleculares PCNA, Ki67, p53 e Bcl2 em tecidos de pacientes dos grupos CA e CEC.

- * P< 0,05, quando comparado com o grupo CEC;
- ** P<0,05, quando comparado com o grupo CA com marcação Ki67;
- *** P< 0,05, quando comparado com o grupo CEC com a marcação Bcl2.

A Figura 5(a, b, c, d) ilustra a imunoexpressão dos marcadores de proliferação celular e apoptose em amostras de tecido do caso oito, representando o grupo de Ceratose Actínica.



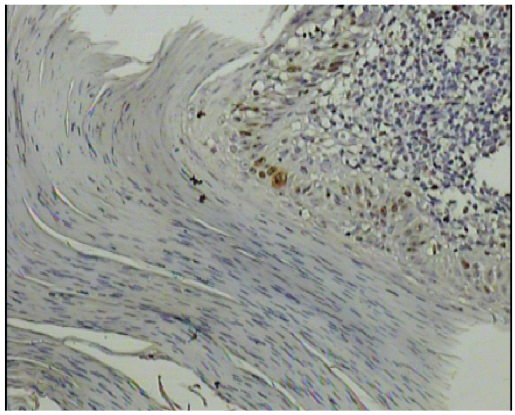
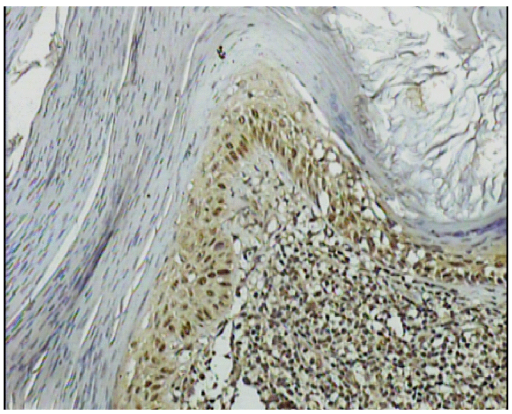


Figura 5a: Ceratose Actínica. Marcador PCNA, positivo (4+) - 100X

Figura 5b: Ceratose Actínica. Marcador Ki-67, positivo (3+) - 100X

DORNELAS, M. T., 2009



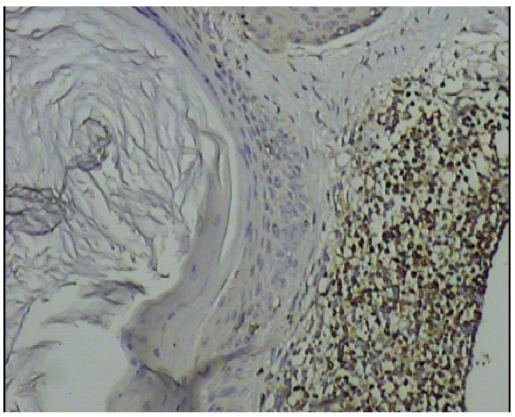
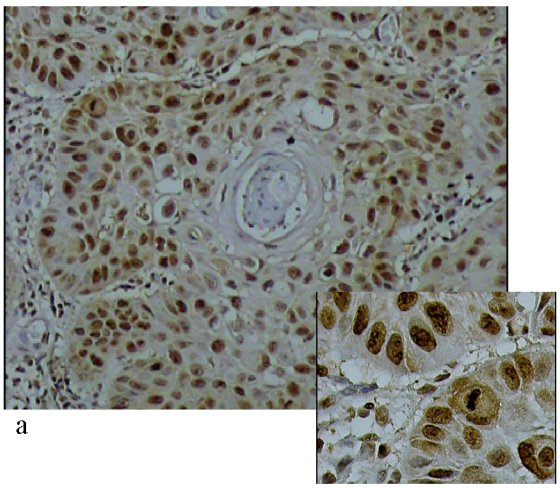


Figura 5c: Ceratose Actínica. Marcador p53, positivo (3+) - 100X

Figura 5d: Ceratose Actínica. Marcador Bcl-2, negativo - 100X

DORNELAS, M. T., 2009

A figura 6 (a, b, c, d) representa a imunoexpressão dos marcadores de proliferação celular e apoptose no caso 20 de Carcinoma Espinocelular, com aumento de 100x. São destacadas com o aumento de 400x, a expressão de PCNA e Ki-67 em células caracteristicamente malignas (FIG 6a e 6b, respectivamente).



a

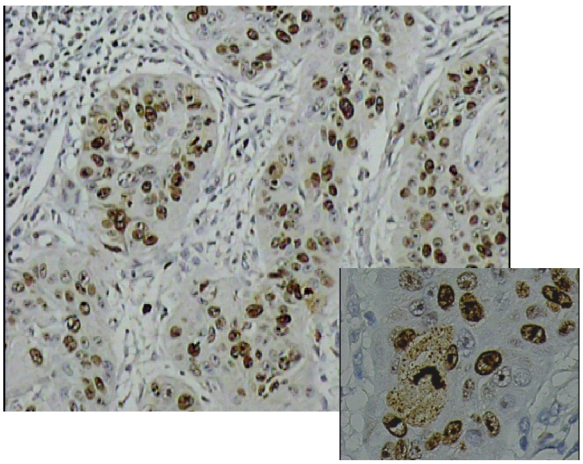
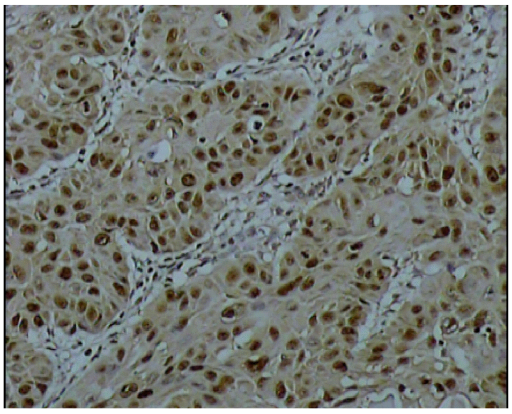


Figura 6a: Carcinoma Espinocelular. Marcador PCNA, positivo (4+) - 100X. Detalhe em 400X.

Figura 6b: Carcinoma Espinocelular. Marcador Ki-67, positivo (4+) - 100X. Detalhe em 400X.

DORNELAS, M. T., 2009



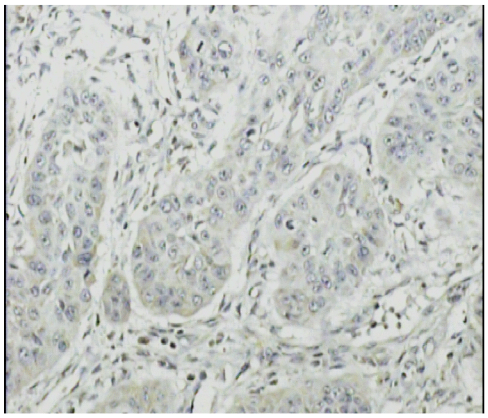


Figura 6c: Carcinoma Espinocelular. Marcador p53, positivo (3+) - 100X

Figura 6d: Carcinoma Espinocelular. Marcador Bcl-2, negativo - 100X

DORNELAS, M. T., 2009

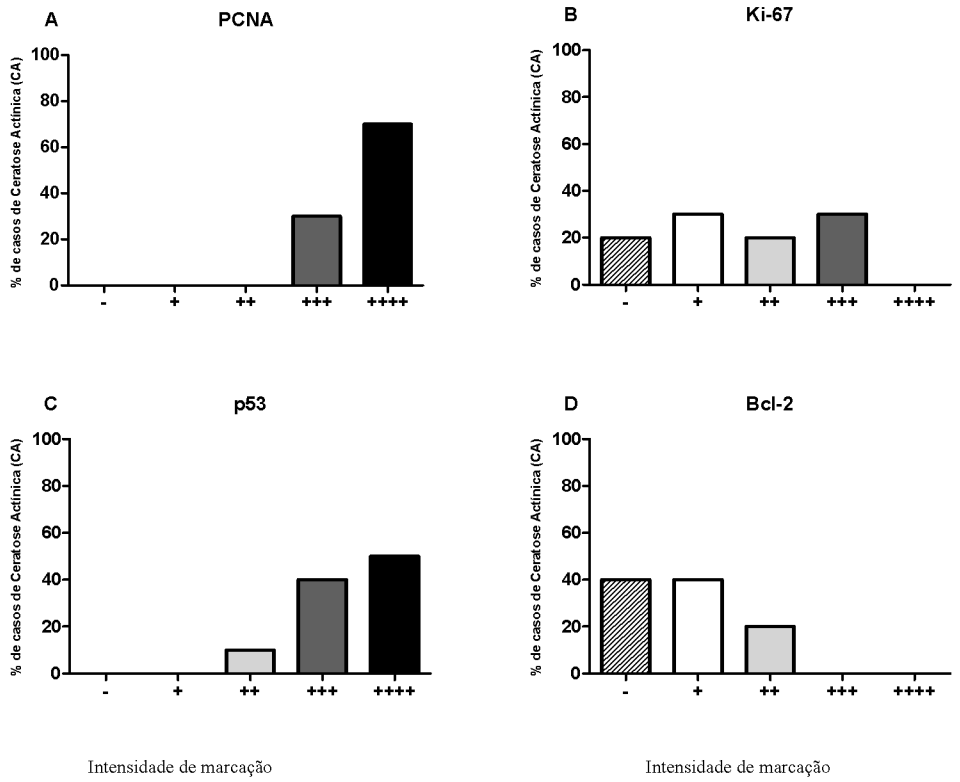


Figura 7: Ceratose Actínica. Expressão dos marcadores
DORNELAS, M. T., 2009

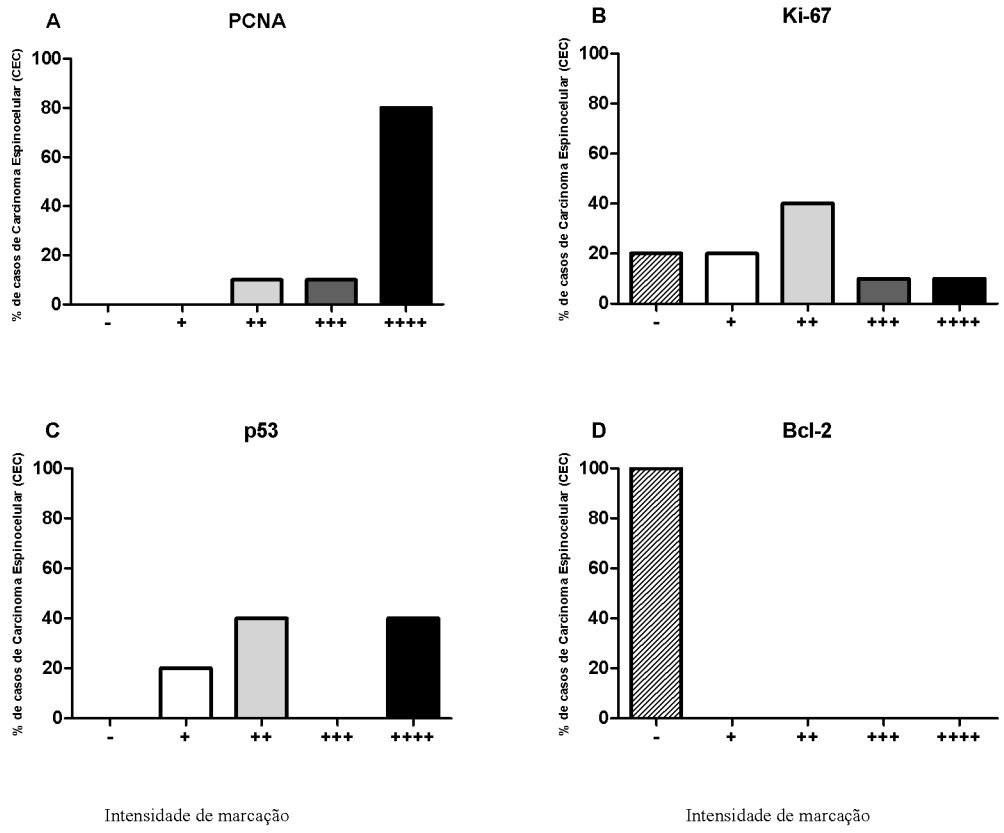


Figura 8: Carcinoma Espinocelular. Expressão dos marcadores
DORNELAS, M. T., 2009

O grupo controle negativo, livre de CA e CEC, com pele de pálpebra resultante de blefaroplastia apresentou atrofia e elastose devido ao envelhecimento e a exposição solar, sem atipias epiteliais. No estudo imuno-histoquímico, evidenciou-se expressão intensa do PCNA, difuso (basal e parabasal). O marcador Ki-67 não foi expresso nas amostras. O p53 e Bcl-2, marcadores de apoptose mostraram expressão fraca (1+), de localização basal em ocasionais células.

5.3 Resultado estatístico

5.3.1 **Análise dos dados**

Como dito anteriormente, em virtude das variáveis consideradas serem do nível ordinal - por método de cruzes, foram empregados testes não-paramétricos para análise das diferenças. Para testar a diferença dos valores médios da mesma proteína, entre os dois diagnósticos, foi aplicado o teste de Mann-Whitney. Para diferenciação dos valores médios entre todas as proteínas, para um mesmo diagnóstico, foi aplicado o teste de Friedman e em seguida, para cada par de proteínas foi usado o teste de Wilcoxon.

O valor médio dos pontos observados para cada proteina em função do diagnóstico foram assim distribuídos. Os valores mais elevados foram observados para PCNA: 3,7 em ambos diagnósticos. Com valores imediatamente inferiores, aparece p53, com valores médios de 3,4 e 2,6 respectivamente para os diagnósticos CA e CEC. As duas proteinas com pontuações mais baixas foram Ki-67 e Bcl2 (com valores médios para CA e CEC, respectivamente de 1,6 e 1,7 para a primeira e 0,8 e 0,0 para a segunda).

O teste de Mann-Whitney, para diferenciar os valores médios das pontuações entre os diagnósticos, apenas foi estatisticamente significante para a proteína que apresentou as pontuações mais baixas, Bcl-2 com índice de 0,005. Apresentando 0,907 para o Ki-67 e 0,726 para o PCNA enquanto que para o p53 foi 0,148.

Por conseguinte, verificamos a existência de significância das diferenças dos valores médios entre as proteínas para cada diagnóstico. O teste de Friedman mostra que as diferenças entre as médias são altamente significativas para os dois diagnósticos (valores de p menores do que 0,1%). Este resultado indica que pelo menos uma proteína apresenta valor médio diferente.

Para saber entre quais proteínas as médias seriam diferentes foi aplicado o teste de Wilcoxon, para cada par, para o diagnóstico de CA e de CEC (Tabela 2).

Para o diagnóstico de Ceratose Actínica, os dados da tabela mostram que a proteína PCNA é diferente de Ki-67 e Bcl2 (valores de p respectivamente iguais a 0,004 e 0,005), e que p53 é estatisticamente diferente da Bcl2 e da Ki-67 (valores de p iguais a 0,004 e 0,011 resp.).

Para o diagnóstico de Carcinoma Espinocelular, a única diferença cujo valor de p foi ligeiramente superior a 5% foi entre as proteínas p53 e a Ki-67 (valor de p igual a 0,071).

Os demais pares apresentaram diferenças estatisticamente significativas.

Tabela 2: Valor de p do Teste de Wilcoxon para diferença entre os pares de marcadores

Marcadores	Ceratose Actínica	Carcinoma Espinocelular
PCNA – Ki-67	0,004	0,007
Bcl-2 – Ki-67	0,146	0,011
p53 – Ki-67	0,011	0,071
Bcl-2 – PCNA	0,005	0,003
p53 – PCNA	0,317	0,026
p53 – Bcl-2	0,004	0,004

DORNELAS, M. T., 2009

Quanto ao gênero, observa-se uma tendência de maior ocorrência de Ceratose Actínica entre as mulheres e do Carcinoma Espinocelular entre os homens, no entanto, a diferença não é significativa (valor de p dado pelo teste exato de Fisher = 0,378).

O teste de Mann-Whitney para diferenciação dos valores médios das pontuações entre os diagnósticos foi relevante para o marcador Bcl-2 que apresentou as pontuações mais baixas.

Outra análise com os pares de proteínas Bcl-2 – Ki-67 e p53 – Ki-67 (apoptose x proliferação), mostrou que no grupo do CEC a relação proliferação (Ki-67) x apoptose (Bcl-2) foi significativa, com $p < 0,05$. Enquanto no grupo CA, a relação p53 x Ki-67 demonstrou marcador de apoptose maior que de proliferação, com $p < 0,05$.

6 DISCUSSÃO

Os tumores de pele constituem o grupo de neoplasias mais comuns nos humanos e, entre estes, os induzidos ou relacionados à excessiva exposição à radiação ultravioleta da luz solar.Tem apresentado incidência crescente nos grupos populacionais de pele clara que habitam áreas temperadas e tropicais do planeta, mesmo com a grande adesão ao uso de bloqueadores solares.

O Carcinoma Espinocelular, CEC, é constituído pela proliferação atípica de ceratinócitos que tem início na camada basal da epiderme. Os ceratinócitos são maiores que os da camada basal normal e perdem sua polaridade. O núcleo é vesicular ou hipercromático e a relação núcleo-citoplasmática se encontra alterada quando comparada aos ceratinócitos normais. Há ruptura na sequência natural de maturação à medida que a lesão torna-se avançada, com atipia de ceratinócitos estendendo-se acima da camada basal (SANINO *et al.* 1994; SCHWARTZ *et al.,* 2003).

O CEC é constituído pela proliferação atípica de ceratinócitos que tem início na camada basal da epiderme. Os ceratinócitos são maiores que os da camada basal normal e perdem sua polaridade. O núcleo é vesicular ou hipercromático e a relação núcleo: citoplasmática está alterada se comparada aos ceratinócitos normais. Há ruptura na seqüência natural de maturação à medida que a lesão torna-se avançada, com atipia de ceratinócitos estendendo-se acima da camada basal (SANNINO *et al.;* 1994).

Quando a atipia de ceratinócitos envolve toda a epiderme a lesão é denominada carcinoma espinocelular "in situ" enquanto que, quando a atipia é menos extensa, mais notada em basal e região parabasal é aplicada a denominação ceratose actínica.(SANNINO *et al.*, 1994 , SMOLLER, 2006).

O diagnóstico em bases histológicas é realizado a partir da análise de fragmentos biópsia de lesões de pele. Embora o CEC da pele tenha um relativo bom prognóstico, informações tais como dimensão da lesão, grau de diferenciação, profundidade de invasão, invasão de bainha neural e vascular e distância das margens de ressecção são imprescindíveis (SM0LLER, 2006).

Em muitos casos, somente a análise histológica não revela o verdadeiro comportamento dessas lesões, podendo ser subestimadas clinicamente quanto ao seu tratamento e acompanhamento (ACKERMAN *et al.,* 2006). É importante que o patologista contribua com informações adicionais de valor prognóstico para o clínico. Outrossim, identificar o exato momento em que a neoplasia contida na epiderme adquire a capacidade de

invadir membrana basal, entra na derme e torna-se potencialmente capaz de dar metástases não é possível, apenas em base histológica.

A ampliação do conhecimento sobre genética molecular e o advento dos marcadores moleculares com uso em cortes em parafina tem tornado possíveis numerosos estudos no sentido de identificar possíveis oncogenes, genes supressores e produtos desses com significado prognóstico no câncer de pele (NAGANO *et al.*, 1993; BATINAC *et al.*, 2004; ACKERMAN *et al.*, 2006 ; MARTINEZ *et al.*, 2006).

Neste estudo comparamos a expressão de imunomarcadores envolvidos no processo de carcinogênese, p53 e Bcl-2 (apoptose) e Ki-67 e PCNA (proliferação celular) em indivíduos portadores de CA e CEC com controles negativos representados por pele livre de tumor, de pálpebra superior, em pacientes submetidos à blefaroplastia.

O gene P53, supressor de tumor, é essencial para a regulação da proliferação celular, tem papel crítico na manutenção da integridade do genoma humano e sua inativação é considerada o evento chave na carcinogenese (BATINAC *et al.*, 2004).

A expressão da proteína p53 em CA e CEC tem variado nas diversas publicações. No estudo em questão, p53 foi expressa em todos os casos avaliados com tendência a exibir maior intensidade nos CA. Nagano *et al.* (1993), utilizando p53 policlonal, encontraram 48% de positividade em 23 casos de CA e 54% de positividade em 14 casos de CEC; Kim *et al.* (2006), utilizando p53 monoclonal encontraram 50% de positividade em dez casos de CA e 90% de positividade nos dez casos de CEC enquanto que Park *et al.* (2004) encontraram 50% de positividade em dez casos de CA e 100% de positividade nos dez casos de CEC. A expressão da p53 em lesões précancerosas como a CA sugere que ela pode ser usada como marcador precoce de malignidade, no entender de Kim *et al.* (2006). Vale salientar que ela foi positiva fraca em ocasionais células nos indivíduos sadios do presente estudo e em 39% das peles normais estudadas por Batinac *et al.* (2004).

A super-expressão da proteína Bcl-2 numa célula geneticamente alterada contribui para a expansão clonal desta por interromper a apoptose, levando a célula a imortalização .

Diferentemente da expressão de p53, Bcl-2 foi expressa em baixa intensidade em seis casos de CA e negativa nos casos de CEC. Balassiano (2004), em seu estudo, identificou a expressão de Bcl-2 em 90% dos 20 casos de Carcinoma Espinocelular do lábio e 75% dos quatro casos de queilite actínica com displasia. Tomkova *et al.* (1998) demonstraram também que não houve expressão de Bcl-2 em pacientes com CEC.

Diversos marcadores para proliferação celular vêm sendo estudados com o objetivo de prever o comportamento e a evolução das lesões pré-neoplásicas e o câncer.

O PCNA, um dos marcadores de proliferação celular estudado, foi expresso uniformemente na camada basal de todas as amostras.

O anticorpo monoclonal DVB-2, marcador de proliferação celular estudado, reconhece, em tecidos fixados em formol e incluídos em blocos de parafina, o epítopo do antígeno Ki-67 (BACCHI *et al.*, 1993). Sua expressão ocorre em quase todas as fases do ciclo celular, exceto na fase G0 em que as células estão em repouso. Neste estudo apenas dois casos de CA e dois de CEC não expressaram o Ki-67, embora tenha sido observada variação na intensidade de marcação.

A expressão do Ki-67 revelou-se importante evidencia de proliferação celular mais acentuada nos CEC. Batinac *et al.*(2004), descreve um padrão similar na expressão do Ki-67 e do p53, sugerindo uma associação entre a proliferação celular e a expressão de p53.

A expressão do Ki-67 e a não expressão de Bcl-2 no grupo CEC parece indicar que esse tipo de tumor correlaciona-se com uma intensificação da atividade proliferativa. Já com relação a CA a maior expressão do p53 com relação a Ki-67 indicando que nesse tipo de lesão ocorre hiper-expressão do p53, diminuem apoptose perpetuando células com dano no DNA não reparado.

Não há na literatura uma definição quanto ao numero ideal da amostra. Diversas vezes deten-se ao que seria estatisticamente significativo. Na pratica, esse numero pode se apresentar restrito devido aos inúmeros fatores. A conservação do material emblocado pode algumas vezes não ser adequada, a quantidade do material não ser suficiente para vários níveis de corte, O tempo que demanda para realizar as reações imunohistoquica, com limitação do numero de marcadores no estudo , devido aos custos.

Com o efeito cumulativo da radiação solar, os danos causados raramente são evidenciados em pacientes jovens, com media de idade dos pacientes variando entre a sexta e sétima década de vida, concordando com a literatura (BALASSIANO, 2004).

Quanto ao genero, sabe-se que as mudanças de padrões sociais ocorridas nos últimos anos, influenciaram no aumento da incidência de tumores cutâneos, devido ao fato das mulheres terem atividades laborativas expostas as radiações ultravioletas. Embora a incidência no sexo masculino seja maior. As mulheres, por apresentarem maiores preocupações estéticas, procuram orientação profissional mais rápido quando percebem alguma patologia cutânea (BALASSIANO, 2004).

O desenvolvimento do CEC e um processo de múltiplas etapas, podendo ser caracterizado em suas fases iniciais, pelo desenvolvimento de lesões pré malignas que podem preceder a neoplasia francamente estabelecida, como e o caso da CA (AGUIAR, 1996).

Deve-se considerar ainda que, se por um lado a recuperação antigênica se mostra benéfica no estudo do p53 e de outros marcadores nucleares, para o PCNA, este mesmo procedimento deve ser mais bem estudado, pela possibilidade de levar a uma super-expressão da proteína, com resultados falso positivos (KUBBUTAT *et al.*,1994; AGUIAR, 1996).Existem aqueles que defendem o uso de microondas, como única possibilidade de se obter reação positiva para o PCNA em imuno-histoquimica (AGUIAR ,1996).

Também experimentamos o processo de panela de pressão na recuperação antigênica, não sendo percebido diferenças significativas. Devido ao grande numero de recuperações antigênicas necessárias para o desenvolvimento dessa pesquisa optamos pelo forno de microondas, pela praticidade e menor tempo no processo como um todo.

De qualquer forma, o uso de marcadores imunohistoquimicos dirigidos a proteínas presentes nos vários estágios do ciclo celular, assegura uma detecção mais apurada das células em proliferação, já que tanto as figuras mitóticas, como os marcadores que são incorporados na fase S, representam apenas uma pequena fração do ciclo celular, fornecendo uma subestimativa das células potencialmente proliferativas (AGUIAR, 1996).

LI *et al.*,(1995), ressalta as dificuldades para quantificação dos resultados imunohistoquimicos obtidos para os anticorpos de proliferação celular. Os métodos sejam eles semi-quantitativos ou com a determinação de índices de marcação pela porcentagem de células positivas em um numero total definido de células, consomem muito tempo e permitem avaliar apenas pequenas amostras que não representa necessariamente todo espécime. Assim optamos pelo método de cruzes, já que uma microscopia cuidadosa fornece resultados reproduzíveis. Utilizamos o sistema proposto por Sannino e Shousha, (1994), que leva em conta a intensidade e extensão da coloração. O ideal seria a associação da contagem manual, ou sistema de cruzes associados a sistemas automatizados que permitissem o al estabelecimento das contagens das células marcadas com mais precisão, conforme utilizou *LI et al.,* (1995).

Com maior conhecimento sobre os mecanismos de controle do ciclo celular, estudos tem sido realizados procurando estabelecer a relação dos diversos marcadores entre si, o que também procuramos realizar nesse trabalho (LOREZ *et al.* , 1994).

Realizamos o teste de Wilcoxon para os diferentes pares de proteínas,como PCNA e Ki67, Bcl-2 e KI67, p53 e KI67, Bcl-2 e PCNA, p53 e Bcl-2. Os resultados encontram-se na tabela abaixo.

O estudo em tumores tem mostrado que, a despeito deste efeito promotor na atividade proliferativa, a maneira pela qual o p53 se relaciona com cada um dos marcadores de

proliferação celular (Ki-67 e PCNA) parece ser independente e variável. Estudos mostram uma correlação entre a expressão da p53 e KI-67 em carcinomas epidermoide de boca, mas não encontram relação entre p53 e PCNA, sugerindo então que a estabilização/inativação da p53 não altera os produtos gênicos relacionados ao PCNA, não conferindo, através dessa via, uma vantagem proliferativa aos tumores.Por outro lado, os resultados obtidos para o KI-67 levaram o autor a concluir que embora a causa da rápida proliferação possa estar na ativação/inativação do outros genes, o aumento da taxa de crescimento nas neoplasias pode ser reflexo da proteína p53 (AGUIAR, 1996).

A identificação da expressão da proteína p53 mostrou-se positiva em todos os casos estudados, com uma distribuição difusa, porem quantitativamente com padrões diferentes, sendo que no grupo de CA essa expressão tende a ser maior que no grupo dos CEC.

Escolhemos o p53, por ser dentre os marcadores imunohistoquimicos, o que mais frequentemente e relatado em associação as fases iniciais de carcinogenese (AGUIAR, 1996).

Vários autores tem relacionado à expressão da proteína p53 nas fases iniciais da carcinogenes e em lesões pré malignas. (AGUIAR , 1996).

Considerando que a CA e uma displasia cutânea, ou mesmo uma lesão precursora do CEC deveriamos esperar uma marcação intensa nos casos de CA para o p-53.

Quanto aos efeitos da fixação na reação do p53, vários autores observaram que fixadores aquosos, principalmente aqueles com mais de 30% de água podem levar ao aparecimento de coloração citoplasmática, pelo menos em células em cultura.Esses autores estudando a p53 através de uma gama de anticorpos dirigidos a diferentes epitopos da proteína, tem relatado também, para alguns deles,a ocorrência de reação citoplasmática (CAMPBELL *et al.*,1993, AGUIAR, 1996).

Acredita-se que reação citoplasmática esteja na verdade relacionada a sensibilidade do sistema de detecção empregado e ao uso ou não do microondas para a recuperação antigênica.mesmo que todas as amostras tenham sido fixadas em solução de formol a 10% , o uso do sistema Streptavidina-Biotina associado ao microondas levou a localização exclusivamente nuclear da reação (AGUIAR, 1996).

Estudos têm demonstrado a superioridade do KI-67 como marcador de proliferação celular, isto se deve ao fato de que este não sofre tantas influencias de fatores internos e externos como o PCNA. A expressão do KI -67 parece não ser tão fortemente abalada por fatores técnicos como fixação e diluição do anticorpo.Outro fator que deve ser levado em consideração contrastando com o PCNA e o fato de KI-67 ter bem definido o período de expressão nuclear (RABENHORST *et al.,* 1993; AGUIAR, 1996).

A imuno-histoquimica do Ki -67 e um método fácil para avaliação do crescimento das neoplasias e tem se mostrado um bom indicador da atividade proliferativa, apresentando relação com outros marcadores como a timidina tritiada (AGUIAR, 1996).

A pesquisa dos protooncogenes, genes supressores tumorais e dos mecanismos de controle do ciclo celular representam tentativas de identificação de biomarcadores que deverão ser utilizados em lesões pré malignas para detectar o nível de risco para desenvolvimento tumoral ou o efeito da intervenção preventiva nos tecidos de risco(AGUIAR, 1996, SHIN et al, 1993).Estes biomarcadores talvez reflitam o efeito dos eventos genéticos importantes para o desenvolvimento tumoral, ou talvez representem a própria detecção do evento genético (LEVINE *et al.*, 1994).

Um principio básico da patologia e gerar um diagnostico apurado, que seja significativo para o cirurgião e útil na determinação do manejo apropriado do paciente.

No momento, parece que não existe ainda um marcador que seja totalmente confiável e conclusivo. Os diversos marcadores disponíveis, inclusive aqueles estudados neste trabalho podem auxiliar o patologista sobre a gravidade das alterações, entretanto, o cirurgião deve ter em mente que o diagnostico do CEC e CA representam em alguns casos como o fator direcionador ao melhor tratamento que devera ser dado a esse paciente.

A utilidade e confiabilidade desses marcadores estão diretamente ligados a sua melhor caracterização , com um maior numero de estudos que correlacione a detecção destes marcadores aos dados clínicos e a outros métodos de avaliação da proliferação celular, já padronizados, como a analise através da morfometria.

A técnica de imuno-histoquimica apresentou-se com sensibilidade e especificidade adequada para a proposta do presente trabalho. Apesar de requerer bastante atenção e cuidados em todas as etapas, inclusive na sua interpretação, a imuno-histoquimica apresenta-se como uma técnica fácil que vem evoluindo e superando dificuldades encontradas.

A expressão do KI-67 nos fornece somente a informação de a célula estar ou não no ciclo celular, mas nada da duração do seu ciclo celular.Como este marcador reflete apenas o momento da vida da célula, e possível que determinada neoplasia apresente alta taxa de proliferação e um baixo percentual de células positivas (ARISAWA *et al.*, 1999).

Trabalhos mostram que o KI -67 não sofre tantas influencias de fatores internos e externos, como o PCNA, sendo por isso superior como marcador de proliferação celular (ARISAWA *et al.*, 1999).

O alto índice de positividade do PCNA encontrado nos tumores aqui estudados,também foi descrito por outros autores (RODRIGUES-VILLANUEVA *et al.*,

1995; ARISAWA *et al.,* 1999), 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 e possível determinar se o elevado numero de células PCNA positivas em uma neoplasia e 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 positiva que pode ser atribuída a sua longa meia –vida. Devido a impossibilidade de se saber se a célula com coloração menos intensa esta ciclando ou não, e sugerido que considere todas as células marcadas, independente da intensidade da coloração (AGUIAR, 1996; ARISAWA *et al.*, 1999), exatamente como foi o nosso procedimento para avaliar e quantificar as células marcadas pelo PCNA.

Devido a longa vida do PCNA, de cerca de 20h, implica que algumas células estejam ainda imunoreativas apos terem deixado o ciclo. De acordo com isso, grande variação e observada quanto ao numero de células marcadas e na intensidade da imunoreacao nuclear do PCNA. Sob certas condições experimentais, cerca de 100% das células são PCNA positivas (AGUIAR, 1996).

O desequilíbrio entre a proliferação e morte celular esta diretamente relacionado com a evolução e comportamento das lesões pré maligna ou potencialmente malignas.Muitas vezes a falta de alterações morfológicas faz com que essas lesões sejam subestimadas mostrando cada vez mais a necessidade da identificação de fatores prognósticos que possam fornecer informações importantes da progressão tumoral dessas lesões (BALLASSIANO , 2004).

Ruksha *et al*., (2007) estudando o receptor periférico benzodiazepínico (PBR), PCNA e caspase-3, envolvidos na síntese de hormônios esteróides, regulação da proliferação celular e apoptose, consideram que células de Carcinoma Espinocelular e melanoma constituem modelos para estudo da função de PBR durante o desenvolvimento de tumores de pele induzidos pela luz UV.

A modulação da proliferação celular e apoptose induzida pela radiação da luz ultravioleta pode ser um potencial alvo terapêutico em tumores malignos de pele.

Novos estudos deverão ser desenvolvidos buscando identificar outros componentes moleculares envolvidos no desenvolvimento do câncer de pele induzido pela luz UV e possíveis agentes terapêuticos.

Assim esse estudo contribui no conhecimento dessas alterações moleculares para empregar, futuramente imunomarcadores na rotina anatomopatologica como fatores prognósticos para o CEC e CA.

7 CONCLUSÃO

A intensidade da expressão de PCNA, Ki-67, p53 e Bcl-2, associada a outros indicadores, tais como a análise histopatológica e a apresentação clínica, fornece informações sobre a provável progressão da neoplasia, permitindo um diagnóstico mais seguro.

Desta forma, a adoção de uma terapia direcionada possibilita um prognóstico favorável em relação aos resultados estético-funcionais e à sobrevida do paciente portador da neoplasia.

A despeito do efeito promotor na atividade proliferativa, a maneira pela qual a p53 se relaciona com os marcadores de proliferação celular (Ki-67 e PCNA) parece ser independente e variável.

Desta forma, as lesões pré invasoras (CA) hiperexpressam p53 com consequente bloqueio da apoptose, decorrente da exposição continua à irradiação UV.

Esses achados sugerem que as taxas de Ki-67 e a expressão p53 e Bcl-2 refletem o grau de malignidade nas lesões cutâneas alvo do estudo.

Perspectivas de novos estudos se prendem na identificação de proteínas envolvidas no processo de perda de diferenciação celular, bloqueio de mecanismos protetores e facilitadores da invasibilidade do estroma e angiogênese.

REFERÊNCIAS

ACKERMAN, A. B.; MONES, J. M. Controversies in Dermatology: Solar (Actinic) Keratosis in Squamous Cell Carcinoma. **British Journal of Dermatology**, New York, v. 155, n. 1, p. 9-22, Jul, 2006.

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.** 110f. Tese (doutorado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1996.

AIROLA, K; JOHANSSON, N.; KARINIEMI, A. L.; KAHARI, V. M.; SAARIALHO-KERE, U. K. Human collagenase-3 is expressed in malignant squamous epithelium of the skin. **Journal of Investigative Dermatology**, Baltimore, v. 109, n. 2, p. 225-31, 1997.

ARISAWA, E. A. L.; MORAES, E.; ROCHA, R. F.; ALMEIDA, J. D. Marcadores biológicos: PCNA e Ki-67, breve revisão. **Revista da Faculdade de Odontologia**, São José dos Campos, v. 2, n. 1, p. 54-60, Jan-Jun, 1999.

BACCHI, C. E; GOWN, A. M. **Detection of cell prolliferation in tissue sections. Brazilian Journal of Medical Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 26, p. 677-87, 1993.

BALASSIANO, K. Z. **Estudo comparativo da expressão imuno-histoquímica das proteínas Bcl-2, p53, caspase-3 e Ki-67 em hiperplasias fibrosas inflamatórias, queilites actínicas e carcinomas de células escamosas no lábio inferior**. Tese (Mestrado em Patologia Bucal), Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2004.

BATINAC, T.; ZAMOLO, G.; JONJIC, N.; GRUBER, F.; PETROVECKI, M. p53 Protein Expression and Cell Proliferation In: Non-Neoplastic and Neoplastic Proloferative Skin Diseases. **Tumori**, Milano, v. 90, p. 120-127, 2004.

BERCOVICI; DUFFOUR, M.; AGRAWAL, S.; SALCEDO, M.; ABASTADO, J. New Methods for Assessing T-Cell Responses Clinical and Diagnostic. In: Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, v. 7, n. 6, p. 859-864, Nov, 2000, Disponível em: <http://cdli.asm.org/cgi/content/full/7/6/859 ?view=lon g&pmid=11063487> Acesso em: 20 Jul. 2005.

BIOSCIENCE. p53 and Human Cancer. Disponível em: <www.bioscience.org/news/scintis/p53.http://216.239.37/104/translate_c?hl=pt-BR&sl=en&u.> Acesso em: 25 out. 2005.

BRAVO, R.; MACDONALD-BRAVO, H. Existence of two populations of cyclin/proliferating cell nuclear antigen during the cell cycle: association with DNA replication sites. **Journal Cell Biology**, New York, v. 105, n. 4, p. 1549-1554, Oct, 1987.

BREUNINGER, H.; BLACK, B.; RASSNER, G. Micro staging of squamous cell carcinomas. **American Journal Clinical Pathology**, Baltimore, v. 94, p. 624, 1990.

BRODLAND, D. G.; ZITELLI, J. A. Surgical margins for excision of primary cutaneous squamous cell carcinoma. **Journal of the American Academy Dermatolology**, St. Louis, v. 27, p. 241, 1992.

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

CABRERA MORALES, C. M.; LÓPEZ-NEVOT, M. A. Efectos de la radiación ultravioleta (UV) en la inducción de mutaciones de p53 en tumores de piel. **Oncología**, Barcelona, v. 29, n. 7, p. 25-32, set, 2006.

CALY, D. N.; CHETER. E. Z.; RAPOPORT, A.; TORLONI, H.; NONOGAKI, S. Expressão do p53 no Carcinoma Epidermóide do Lábio. **Revista Colégio Brasileiro Cirurgia**. [periódico na internet] v. 34, n. 2, 2007. Disponível em URL:http:// www.scelo.br/rcbc
.

CAMPBELL, C.; QUINN, A. G.; RO, Y-S.; ANGUS, B. REES, J. L. p53 mutations are common and early events that precede tumor invasion in squamous cell neoplasia of the skin. **Journal of Investigative Dermatology**, New York, v. 100, n. 6, 746-748, Jun 1993.

CAVALCANTI JR, G. B.; REZENDE, L. M. A. M.; DOBBIN, J. A. Citometria de fluxo, imuno-histoquimica e Western Blot na Detecção da Expressão da proteína p53 em Células Tumorais: uma Analise Comparativa. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, Porto Alegre, v. 35, n. 3, p. 135-142, 2003.

CHANG, C. H. ; TSAI,R.K. ; CHEN,G.S. ; YU,H.S. ; CHAI,C.Y. Expression of bcl-2, p53 and Ki-67 in arsenical skin cancers. **Journal of Cutaneous Pathology**, Copenhagen, v. 25, n. 9, p. 457-62, 1998.

COCKERELL, C. Histopathology of incipient intraepidermal squamous cell carcinoma ("Actinic Keratosis"). **Journal of the American Academy Dermatology**, St. Louis, v. 42, n. 1, p. 11, 2000.

COLEMAN, B.; FRIEDHOFER, H.; RIVITTI, E. A.; ANGER, M.; SOUSA, L. C.; GOLCMAN, R.. Carcinoma Basocelular e Espinocelular da Pele. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 53, n. 54, p. 373-383, 1978.

DINEHART, S. M.; POLLACK, S. V. Metastases from squamous cell carcinoma of the skin and lip. **Journal of the American Academy Dermatology**, St. Louis, v. 21, p. 241, 1982.

DODSON, J. M.; DE SPAIN, J.; HEWETT, J, E.; CLARK, D. P. Malignant potential of actinic keratosis and the controversy over treatment. A Patient-oriented perspective. **Archives of Dermatology**, Chicago, v. 127, p. 1029, 1991.

DU VIVIER, A. **Atlas of Clinical Dermatology**. p. 9.6-9.8; 9.13-9.17, London: Mosby-Wolfe, 1994.

ELDER, D. E.; ELENITSAS, R.; JOHNSON JR, B. L.; MURPHY, G. F. **Lever's histopathology of the skin**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 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**. Tese (Doutorado em Patologia) – Escola Paulista de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

FARMER, E. R.; HOOD, A. F. **Pathology of the skin**. 2nd Edition, Indiana: McGraw-Hill, 2000.

FITZPATRICK, T. B.; EISEN, A.Z.; WOLFF, K.; FREEDBERG, I. M.; AUSTEN, K. F. eds. **Dermatology in General medicine**, 6th Edition, New York: McGrow-Hill, 2003

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

GERDES, J.; SCHWAB, U.; LEMKE, H.; STEIN, H. Production of a mouse monoclonalantibody reactive with a nuclear antigen associated with cell proliferation. **International Journal of Cancer**, New York, v. 31, p. 13-20, 1983

HABIF, T. P. **Dermatologia Clínica** – Guia Colorido para Diagnóstico e Tratamento. v. 21, p. 738-749, Porto Alegre: Artmed, 2005.

HEAPHY JR, M. R.; ACKERMAN, A. B. The nature of solar keratosis: a critical review in historical perspective. **Journal of the American Academy Dermatology**, St. Louis, v. 43, p. 138-50, 2000.

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 Dermatology**, St. Louis, v. 29; n. 5, p. 741-748, 1993.

HOSAL, I. N.; ONERCI, M.; KAYA, S.; TURAN, T. Squamous cell carcinoma of the lower lip, **American Journal of Otolaryngology**, Philadelphia, v. 13, n. 6, p. 363-65, 1992.

HUANG, Z. Bcl-2 family proteins as targets for anticancer drug design. **Oncogene**, Basingstoke, v.19, n. 56, p. 6627-31, Dec, 2000.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. Câncer de Pele não Melanoma. Disponível em: <www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=334> Acesso em: 24 Out. 2006.

JACKSON, S.; GHALI, L.; HARWOOD, C.; STOREY, A. Reduced apoptotic levels in squamous but not basal cell carcinomas correlates with detection of cutaneous human papillomavirus. **British Journal of Cancer**, London, v. 87, n. 3, p. 319-23, May, 2002.

JENSEN, P; MOLLER, B; HANSEN, S. Skin Cancer in kidney and heart transplant recipients and different long-term immunosuppressive therapy regimens. **Journal of the American Academy Dermatology**, St. Louis, v. 42, p. 307, 2000.

KERR, J. F. R.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **British Journal of Cancer**, London, v. 26, p. 239-57, 1972.

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

KIM, K. H.; PARK, E. J.; SEO, Y. J.; CHO, H. S.; KIM, C. W.; KIM, K. J.; PARK, H. R. Immunohistochemical study of cyclooxygenase-2 and p53 expression in skin tumors. **Journal of Dermatology**, Tokyo, v. 33, n. 5, p. 319-325, May, 2006

KUBBUTAT, M. H. G.; KEY, G.; DUCHROW, M.; SCHLUTER, C.; FLAD, H. D.; GERDES, J. Epitope analysis of antibodies recognising the cell proliferation associated

nuclear antigen previously defined by the antibody ki-67 (ki-67 protein). **Journal of Clinical Pathology**, London, v. 47, p. 524-528, 1994.

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

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

KUSHIDA, Y.; MIKI, H.; OHMORI, M. Loss of heterozygosity in actinic keratosis, acquamous cell carcinoma and sun-exposed normal-appearing skin Japanese: difference between Japanese and Caucasians. **Cancer Lett**, v. 140, n.1, p. 169-75, 1999.

LEFFELL, D. J. The scientific basis of skin cancer. **Journal of the American Academy Dermatology**, St. Louis, v. 42, p. 18-22, 2000.
LEVINE, A. J.; MOMAND, J.; FINLAY, C. A. The p53 tumor supressor gene. **Nature**, London, v. 231, n. 6326, p. 453-456, Jun.1991.

LEVINE, A. J. ; PERRY, M. E.; CHANG, A.; SILVER, A.; DITTMER, D.; WU, M.; WELSH, D. The 1993 Walter Hubert Lecture: the role of the p53 tumour-supressor gene in tumorigenesis. **British Journal of Cancer**, London, v. 69, 409-416, 1994.

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.

LO MUZIO, L.; PANNONE, G.; STAIBANO, S.; MIGNOGNA, M. D.; RUBINI, C.; MARIGGIÒ, M. A.; PROCACCINI, M.; FERRARI, F.; DE ROSA, G.; ALTIERI, D. C. Expression of the apoptosis inibitor surviving in aggressive squamous cell carcinoma. **Experimental and molecular pathology**, New York, v. 70, n. 3, p. 249-54, 2001.

LORZ, M.; MEYER–BREITING, E.; BETTINGER, R. Proliferating cell nuclear antigen counts as markers of cell proliferation in head and neck cancer. **European archives of oto-rhino-laryngology**, Germany, v. 251, n. 2, p. 91-94, Feb.1994.

LU, S.; TIEKSO, J.; HIETANEN, S.; SYRJÄNEN, K.; HAVU, V. K.; SYRJÄNEN, S. Expression of cell-cycle proteins p53, p21 (WAF-1), PCNA and Ki-67 in benign, premalignant and malignant skin lesions with implicated HPV involvement. Acta **dermato-venereologica**, Stockholm, v. 79, n. 4, p. 268-73, 1999.

MACIEL, E. D.; SERRA, M. C. **Tratado de Queimaduras**. 1ª Ed., São Paulo: Atheneu, p. 553-565, 2004.

MARKS, R.; FOLEY, P.; GOODMAN, G.; HAGE, B. H.; SELWOOD, T. S. Spontaneous remission of solar keratosis: the case for conservative management. **British Journal of Cancer**, London, v. 115, p. 649, 1986.

MARKS, R.; RENNIE, G.; SELWOOD, T. S. Malignant transformation of solar keratoses to scquamous cell carcinoma, **Lancet**, London, v. 1, p. 795, 1988.
MARTINEZ, M. A. R.; FRANCISCO, G.; CABRAL, L. S.; RUIZ, I. R. G.; NETO, C. F. Genética Molecular aplicada ao câncer cutâneo não melanoma. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 81, n. 5, Set-Out, 2006.

MEHEREGAN, A.; HASHIMOTO, K.; MEHEREGAN, D.; MEHEREGAN, D. Epidermal precancer, squamous cell carcinoma, and pseudocarcinoma. In: Mehregan, A. H. 750p. **Pinkus' guide to Dermatohistopathology**, 6th Edition, Norwalk: Appleton & Lange, p. 541-563, 1995.

MÉLEGA, J. M. **Cirurgia Plástica** – Fundamentos e Arte, São Paulo: Medsi, v. 1, p. 357-60, 2002.

MONTESANO, R.; HAINAULT, P.; HALL, J. The use of biomarkers to study pathogenesis and mechamisms of cancer: oesophagus and skin cancer as model. **IARC scientific publications**, France, v. 142, p. 291-301, 1997.

MORALES-DUCRET, C. R. ; VAN DE RIJN, M. ; LEBRUN, D. P. ; SMOLLER, B. R.; Bcl-2 expression in primary malignancies of the skin. **Archives of dermatology**, Chicago, v. 131, p. 909-912, Aug, 1995.

MOY, R. Clinical presentation of actinic keratoses and squamous cell carcinoma. **Journal of the American Academy Dermatology**, St. Louis, v. 42, p. 8, 2000.

NAGANO, T.; UEDA, M.; ICHIHASHI, M. Expression of p53 protein is an early event in ultraviolet light-induced cutaneous squamous cell carcinogenesis. **Archives of dermatology**, Chicago, v. 129, p. 1157-1161, Set, 1993.

MURAKAMI, M; OHTANI, I; HJO,H; WAKASA, I. Immunohistochemical evaluation with Ki-67: An application to salivary gland tumours. The journal of Laringology and Otology, v.106,p35-38, Jan. 1992.

O'GRAY. A.; DUNNE, C.; O'KELLY, P.; MURPHY, G. M.; LEANDER, M.; KAY, E. Diferential expression of matrix metalloproteinase (MMP) – 2 ,MMP – 9 and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP) – 1 and TIM – 2 in non-melanoma skin cancer: implications for tumour progression.**Histopathology,** Oxford, v. 51, n. 6, p. 793-804, 2007

ORTONNE, J. P. From actinic keratosis to squamous cell carcinoma. **British Journal of Cancer**, London, v. 146, supl. 61, p. 20-22, 2002.

PAPADIMITRIU, J. C.; IOFFE, O. B.; CATELLANI, R. J. Shifting of citoplasmic pattern of bcl-2 expression in reactive and preneoplastic lesions to nuclear patternin their malignant counterparts. **Cancer detection and prevention**, New York, v. 20, p. 529-30a, 1996.

PARK, H. R.; MIN, S. K.; CHO, H. D.; KIM, K. H.; SHIN, H. S.; PARK, Y. E. Expression profiles of p63, p53, survivin and htert in skin tumors. **Journal of Cutaneous Pathology**, Copenhagen, v. 31, p. 544-49, 2004.

PEREIRA, A. C. CARMO, E. D.; SILVEIRA, V. Á. S.; AMADEI, S. U.; ROSA, L. E. B. O papel das MMP-2 e 9 no desenvolvimento do Carcinoma Epidermóide. **Revista Brasileira de Cancerologia**, Rio de Janeiro, v. 52, n. 3, p. 257-262, 2006.

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. Tese de doutorado. Fac odont U.S.P. São Paulo, 1997.

RABENHORST, S. H.; BURINI, R. C.; SCHMITT, F. C. L. Ciclo Celular: Mecanismos Reguladores e Marcadores Bioquímicos. **Revista Brasileira de Cancerologia**, Rio de Janeiro, v. 40, n. 3, p. 141-147, 1994.

RABENHORST, S. H.; BURINI, R. C.; SCHMITT, F. C. L. Marcadores da Proliferação Celular. **Revista brasileira de patologia clínica**, Rio de Janeiro, v. 29, n.1, p. 24-29, 1993.

RIBEIRO, R. I. M. A; BORGES JR, P. C.; CARDOSO, S, V.; CANDELORI, I.; ESPÍNDOLA, F. S.; CASSALI, G. D.; LOYOLA, A. M. Expressão de metaloproteínas de matriz e de seus inibidores teciduais em Carcinomas Basocelulares. **Jornal brasileiro de patologia e medicina laboratorial**, Rio de Janeiro v. 44, n. 2, p.115-121, 2008.

RESZEC, J.; SULKOWSKA, M.; KODA, M.; KANCZUGA-KODA, L.; SULKOWSKI, S. Expression of cell proliferation an apoptosis Markers in Papillomas and Cancers of Conjuctiva and Eyelid. **Annais of New York Academy of Sciences**, New York, v. 1030, p. 419-26, 2004.

RODRIGUEZ-VILLANUEVA, J.; COLOME, M. I.; BRISBAY, S.; MCDONNELL, T. J. The expression and localization of Bcl-2 protein in normal skin and in non-melanoma skin cancers. **Pathology, research and practice**, Stuttgart, v. 191, n. 5, p. 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 of clinical pathology**, London, v. 47, p. 1010-1014, 1994.

ROWE, D. E.; CARROLL, R. J.; DAY JR, C. L. Prognostic factors for local recurrence, metastasis, and survival rates in squamous cell carcinoma of the skin, ear, and lip. Implications for treatment modality selection. **Journal of the American Academy Dermatology**, St. Louis, v. 26, n.6, p. 976, 1992.

RUKSHA, T. G.; SALMINA, A. B.; SOKOLOV, V. D.; MAKSIMOVA, T. V.; ANISIMOV, Y. U. A. Expression of Peripheral Benzodiazepine Receptor, PCNA, and Caspase-3 in Cells of Skin Melanoma and Squamous Cell Carcinoma. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, London, v. 144, n. 1, p. 77-79, Jul, 2007.

SANNINO P.; SHOUSHA, S. Demostration of oestrogen receptors in paraffin wax sections of breast carcinoma using the monoclonal antibody 1D5 and microwave ove processing. **Journal of Clinical Pathology**, London, v. 47, p. 90-92, 1994;

SCHWARTZ, R. A.; STOLL JR, H. L. Epithelial precancerous lesions. In: Fitzpatrick TB, Eisen AZ, Wolff K, Freedberg IM, Austen KF, eds. **Dermatology in General medicine**. New York, NY: McGrow-Hill; 2003: 733-746p.

SHIMIZU, T.; MURAKAMI, T.; OGA, A.; FURUMOTO, H.; NAKANO, J.; MUTO, M. Prognostic significance of expression of p53 protein and Ki-67 antigen in well-differentiated squamous cell carcinoma of the skin. **Journal of Dermatology**, Tokyo, v. 26, n. 12, p. 837-40, 1999.

SKALOVA, A; LEIVO, I;VON BOGUSLAWSKY, K;SAKSEIA,E. 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.

SMOLLER, B. R.; Squamous cell carcinoma: from precursor lesions to higth-risk variants. **Modern Pathology**, Baltimore, 2006. 19v. S88-S92.

SOEHNGE. H.; ANANTHASWAMY, H. N.; Mecanisms of induction of skin cancer by UV radiation. **Frontiers Bioscience**, Tampa, v. 2, p. 538-51, 1997

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.; KAPRANOS, N.; PETRAKOU, E.; ANASTASIADOU, A.; PAGOUNI, A.; CHRISTOFIDOU, E.; PETRIDIS, A.; PAPADOPOULOS, O.; KOKKA, E.; ANTONIOU, C.; GEORGALA, S.; KATSAMBAS, A. D. Immunophenotypic Analysis of the p53 Gene in Non-Melanoma Skin Cancer and Correlation With Apoptosis and Cell Proliferation. **Journal European Academy of Dermatology and Venereology**, Amsterdam, v. 9, n. 2, p. 180-6, 2005.

TILLI, C. M. L. J.; VAN STEENSEL, M. A. M.; KREKELS, G. A. M.; NEUMANN H. A. M.; RAMAEKERS, F. C. S.; Molecular aetiology and pathogenesis of basal cell carcinoma. **British Journal of Dermatology**, London, v. 152, n. 6, p. 1108-1124, 2005.

TOMKOVA, H.; FUJIMOTO, W.; ARATA, J. Expression of the bcl-2 homologue bax in normal human skin, psoriasis vulgaris and non-melanoma skin cancers. **European journal of dermatology**, Mountrouge, v. 8, n. 4, p. 256-60, Jun, 1998.

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**, Amsterdam, v. 11, p. 36-40, 1996.

VASSALO, J. **Manual de Imuno-Histoquímica da Sociedade Brasileira de Patologia**, 270p. Venâncio Avancini Ferreira Alves e Carlos Eduardo Bacchi eds, 2001.

WIKONKAL, N. M.; BERG, R. J.; VAN HASELEN, C. W.; HORKAY, I.; REMENYIK, E. Bcl-2 versus p53 protein expression and apoptotic rate human nonmelanoma skin cancers. **Archives of Dermatology**, Chicago, v. 133, p. 599-602. May, 1997.

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo