

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE – UFCSPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA**

Ana Carolina Krum dos Santos

**A Expressão Imuno-Histoquímica da
Alfa-Actina nos Carcinomas
Basocelulares**

UFCSPA

Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre

**Porto Alegre
2021**

Ana Carolina Krum dos Santos

A Expressão Imuno-Histoquímica da Alfa-Actina nos Carcinomas Basocelulares

Dissertação/Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre como requisito para a obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Renan Rangel Bonamigo
Coorientadores: Prof Renato Marchiori Bakos e Prof André da Silva Cartell

**Porto Alegre
2021**

Catalogação na Publicação

Krum dos Santos, Ana Carolina

A Expressão Imuno-Histoquímica da Alfa-Actina nos Carcinomas Basocelulares / Ana Carolina Krum dos Santos. -- 2021.

55 f. : il., tab. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) -- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em Patologia, 2021.

Orientador(a): Renan Rangel Bonamigo ;
coorientador(a): André Cartell, Renato Marchiori Bakos.

1. carcinoma basocelular. 2. alfa-actina de músculo liso. 3. imuno-histoquímica. 4. carcinogênese. 5. dermatopatologia. I. Título.

Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da UFCSPA com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Agradecimentos

À Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, por possibilitar acesso a essa nova etapa de conhecimento, e a seus professores e funcionários, por todo o aprendizado e pela disponibilidade em ajudar.

Ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre e a seus funcionários do Serviço de Dermatologia, do Serviço de Patologia e do Centro de Pesquisa Clínica em Patologia, por novamente abrirem as portas para a pesquisa e o ensino.

A meus orientadores, Prof. Renan Bonamigo, Prof. Renato Bakos e Prof. André Cartell, pela maestria do tema e das habilidades necessárias à transmissão do saber em dermatopatologia.

À minha família, pelo apoio incondicional durante minha formação e pelo incentivo durante o caminho.

Resumo da Dissertação

Introdução: O carcinoma basocelular (CBC) é a neoplasia maligna mais comum da pele. Apesar da sua grande prevalência, geralmente o CBC não ocasiona metástases, sendo reconhecido por seu potencial de invasão local. Alguns estudos, com séries de casos, relacionaram a presença de alfa-actina de músculo liso com a invasão tumoral nos subtipos de CBC mais agressivo. Comprovando-se a relação entre a alfa-actina e a invasão tumoral, seria possível prever o comportamento de um carcinoma basocelular na invasão de tecidos locais, auxiliando na decisão terapêutica. **Objetivos:** o objetivo principal foi verificar a prevalência da positividade para alfa-actina, à imuno-histoquímica, em carcinomas basocelulares de baixo risco (superficial, nodular, fibroepitelioma) e de alto risco (infiltrativo, morfeiforme, basoescamoso, esclerosante e micronodular) e o objetivo secundário foi descrever a relação entre a expressão imuno-histoquímica da alfa-actina e as seguintes variáveis: idade do paciente; topografia do CBC; padrão clínico da lesão; descrição dermatoscópica; tamanho da lesão, espessura tumoral; presença de ulceração e recidiva das lesões em 5 anos. **Materiais e Métodos:** Foram avaliados 100 casos de CBC diagnosticados em 2014 no Serviço de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (Brasil), a partir de blocos de parafina de pacientes com exérese do carcinoma basocelular. Foi realizada a imuno-histoquímica para alfa-actina de músculo liso. Os seguintes dados de prontuário foram analisados: idade; topografia da lesão, se em área fotoexposta ou não fotoexposta; impressão clínica da lesão, se CBC superficial, nodular ou infiltrativo; descrição dermatoscópica; espessura tumoral; presença ou ausência de ulceração e a presença de recidiva da lesão em até 5 anos de

acompanhamento. **Resultados:** a prevalência da alfa-actina estromal foi de 33% nos CBC em geral, 23% nos de baixo risco e 59% nos de alto risco. A prevalência da alfa-actina nas células tumorais foi de 37% nos CBCs em geral, 48% nos de baixo risco e 33% nos de alto risco. Houve associação estatisticamente significativa quanto à presença da proteína alfa-actina no estroma tumoral e as variáveis subtipo agressivo ($p=0,001$, $\phi = 0,34$) e recidiva tumoral em até 5 anos ($odds\ ratio = 1,896$ IC95% = 0,771 – 4,659). Não houve associação estatisticamente significativa entre presença de alfa-actina estromal e as demais variáveis estudadas (idade, topografia, espessura tumoral, tamanho da lesão). Não foi demonstrada associação entre presença de alfa-actina nas células tumorais e as variáveis estudadas.

Conclusão: a alfa-actina de músculo liso está frequentemente expressa no estroma dos carcinomas basocelulares, relacionando-se aos fatores subtipo agressivo e recidiva tumoral, e pode corroborar a hipótese de o mecanismo de invasão tumoral ser dependente dos miofibroblastos.

Palavras-chave: carcinoma basocelular, imun-histoquímica, actina

Abstract

Introduction: Basal cell carcinoma (BCCs) is a common skin cancer that is locally invasive, but rarely metastasizes.. Case series correlated alpha-actin expression with tissue invasion in most aggressive subtypes. Proving the relationship between α -smooth muscle actin expression and tumor invasion could help predict a tendency for BCCs to spread locally, thus helping in therapeutic decision. **Aim of study:** to describe the rate of alpha-actin positiveness in low risk (superficial, nodular, fibroepithelioma) and high risk (infiltrative, morpheaform, basosquamous, micronodular) basal cell carcinomas and the relationship between actin positivity and the following variables: patient's age, tumor location, tumor subtype, tumor size and thickness, presence or absence of ulceration and 5-year clinical recurrence proven by biopsy. **Materials and methods:** 100 paraffin blocks from surgeries performed were identified and reviewed. Subsequently, smooth muscle alpha-actin immuno-histochemistry was performed. The following information were extracted from medical records: patient's age, tumor location, tumor subtype, tumor size and thickness, presence or absence of ulceration and 5-year clinical recurrence proven by biopsy. **Results:** 33% of all BCCs, 23% of low risk BCCs and 59% of high risk BCCs showed stromal alpha-actin positivity. 37% of all BCCs, 48% of low risk BCCs and 33% of high risk BCCs showed cellular alpha-actin positivity. There was a statistically significant correlation between stromal α -smooth muscle actin positivity and aggressive subtypes of BCC ($p=0,001$, $\phi = 0,34$). The association between the positivity in the stroma and the recurrence rate was of 1.8 (odds ratio = 1,896 IC95% = 0,771 – 4,659). Other tumor

characteristics (tumor thickness, location, ulceration, and size) and age group were not significantly related to immunohistochemical positivity to α -smooth muscle actin. There was no statistically significant correlation between tumor cell α -smooth muscle actin positivity and any of the tumor characteristics and age group

Conclusion: alpha-actin stromal positivity is congruent with the proposed mechanism of tissue invasion in BCCs, which is dependent on fibroblast myoepithelial differentiation. These cells thus acquire motility capability and invade adjacent tissues. Positivity in tumor cells was not associated with a worse prognosis.

Keywords: basal cell carcinoma, immuno-histochemistry, actin

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CBC: Carcinoma Basocelular

INCA: Instituto Nacional do Câncer

IHQ: Imuno-Histoquímica

α -AML: Alfa-Actina de Músculo Liso

TGF- β : Fator de Crescimento Tumoral-Beta

FACs: Fibroblastos Associados a Câncer

UFCSPA: Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

HCPA: Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Lista de Quadros

Quadro 1: Histopatologia dos Subtipos de Carcinoma Basocelular.....	15
Quadro 2: Prevalência dos Subtipos de Carcinoma Basocelular.....	17
Quadro 3: Principais Marcadores Imuno-Histoquímicos do Carcinoma Basocelular.....	21

SUMÁRIO

1. REFERENCIAL TEÓRICO	12
1.1 O Carcinoma Basocelular	
1.1.1 Definição e Epidemiologia.....	12
1.1.2 Quadro Clínico.....	13
1.1.3 Histopatologia.....	14
1.1.4 Tratamento.....	19
1.2 Alfa actina	
1.2.1 Características gerais.....	18
1.2.2 Estudo da imuno-histoquímica.....	20
1.2.3 Alfa-actina e mediadores carcinogênicos do carcinoma basocelular.....	22
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24
3. OBJETIVOS	30
3.1 Geral.....	30
3.2 Específicos.....	30
4. ARTIGO CIENTÍFICO REDIGIDO EM INGLÊS	31
5. CONCLUSÕES.....	45
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	47
7. APÊNDICES	47
7.1 Técnica de Imuno-histoquímica.....	48
7.2 Ficha de Avaliação.....	49
8. ANEXOS.....	50
8.1. Parecer do Comitê de Ética da UFCSPA.....	52

1. REFERENCIAL TEÓRICO

1.1 O Carcinoma Basocelular

1.1.1 Definição e Epidemiologia

O carcinoma basocelular (CBC) é a neoplasia maligna mais comum da pele. Origina-se da camada basal da epiderme e dos folículos pilosos. É definido como neoplasia maligna composta por queratinócitos germinativos análogos aos da unidade embrionária folículo-sebáceo-apócrina.¹

O CBC é mais prevalente em áreas próximas à linha do Equador. Entretanto, a Austrália é o país com mais altas taxas para CBC, com algumas regiões apresentando incidência de 2% ao ano. Embora as taxas permaneçam altas em homens idosos, há tendência de aumento em mulheres jovens.²

No Brasil, segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), os cânceres de pele não-melanoma constituem 30% de todas as neoplasias; destes, estima-se que de 70 a 80% dos cânceres de pele não-melanoma representem carcinomas basocelulares. Abaixo dos 40 anos de idade, a prevalência do tumor é superior em mulheres; acima dos 60 anos, esse padrão é invertido. Tais dados são pouco precisos, devido à neoplasia provocar poucas internações e não constituir doença de notificação compulsória. Em 2020, a incidência de CBC é estimada em 176.930 novos casos, dos quais 83.770 em homens e 93.160 em mulheres, e de mortalidade de 1,1%.^{3,4}

1.1.2 Quadro Clínico

Clinicamente, o carcinoma basocelular caracteriza-se por placa, pápula ou nódulo eritematoso com brilho perolado, telangiectasias variando de lineares e arboriformes. A dermatoscopia identifica as estruturas descritas para o CBC, como vasos arboriformes, telangiectasias finas e curtas, estruturas em raio de roda e folha de bordo, além de glóbulos azul-acinzentados e ninhos ovóides.⁵ A presença de pigmento melanocítico está relacionada a fototipos de pele mais altos. Pode ocorrer ulceração, sendo mais relacionada ao subtipo nodular da neoplasia, embora possa ocorrer em todas as variantes tumorais.¹

Sua localização mais frequente é em áreas fotodanificadas da cabeça, pescoço e tronco, raramente se desenvolvendo em palmas e plantas ou em membranas mucosas, como na mucosa nasal e na vulva.⁶

Enquanto o carcinoma espinocelular, outra neoplasia de pele não melanoma, está relacionado à exposição solar cumulativa, o fator de risco associado ao CBC envolve exposição intermitente e recreacional, comum no sul do Brasil. Essa relação é particularmente importante quando a exposição ocorre na infância e adolescência, tendo efeito cumulativo.⁹

Além da radiação ultravioleta, os fatores de risco identificados para a neoplasia são: idade avançada; fototipos de pele baixos; tratamento com radioterapia local; história familiar; exposição a arsênico, psoraleno e derivados de alcatrão; síndromes genéticas, como a síndrome de Gorlin; imunossupressão por transplante de órgãos sólidos.^{7,8} Cicatrizes e úlceras crônicas, áreas de alta atividade inflamatória e fibroplasia, são riscos

importantes para o desenvolvimento de CBC em áreas não expostas à radiação ultravioleta.⁹

É um tumor de crescimento lento, com capacidade de invasão local, recidivante, com rara metastatização (0,0028% a 0,55%, sendo 400 casos descritos na literatura). Os locais de metastatização descritos são linfonodos regionais, ossos, pulmões e pele.^{1,3} A mortalidade é rara, ocorrendo mais frequentemente em indivíduos imunossuprimidos ou com síndromes clínicas. Sua agressividade possui diversos fatores de risco conhecidos, sendo um dos principais o tipo histológico da lesão.³

1.1.3 Histopatologia

O exame histopatológico é essencial para a confirmação diagnóstica e estimativa do risco de recidiva.¹⁰ De forma geral, o CBC caracteriza-se por células tumorais basaloides brotando da epiderme ou de folículos, ou então no interior da derme, com atipia variável. Frequentemente apresenta artefato de retração, caracterizado por espaços vazios entre o estroma e os lóbulos de células tumorais. A epiderme pode estar ulcerada. Os núcleos podem estar dispostos em paliçadas periféricas aos lóbulos. Mucina pode estar presente no estroma ou no interior de agregados basaloides. A derme pode apresentar elastose solar, refletindo a origem comum de CBCs em pele fotodanificada. Invasão perineural está presente em subtipos agressivos; o infiltrado linfoplasmocitário é variável, com raros folículos linfoides ao redor do tumor.¹¹

De acordo com os critérios do *Royal College of Pathologists* (2014), para a descrição histopatológica da neoplasia, em concordância com os critérios da

Organização Mundial de Saúde, os subtipos de CBC de alto risco são o CBC infiltrativo, morfeiforme/esclerosante, micronodular e basoescamoso. Carcinomas basocelulares superficiais, nodulares e fibroepiteliomas são descritos como de baixo risco. De acordo com esse consenso, não há valor clínico na diferenciação entre os tumores de alto risco, visto que apresentam prognóstico semelhante, propondo-se a denominação comum de carcinomas “infiltrativos”. Os principais subtipos de CBC estão detalhados no Quadro 1.

Quadro 1. Histopatologia dos Subtipos de Carcinoma Basocelular

Subtipo	Histopatologia
Infiltrativo	Cordões finos de células basaloides invasivas na derme.
Morfeiforme	Clinicamente semelhante a uma cicatriz. Cordões finos de células basaloides invasivas em um estroma fibroso.
Micronodular	Múltiplas ilhas sólidas de tumor basaloide de tamanho inferior ao de um folículo piloso.
Basoescamoso	Características combinadas de carcinoma basocelular e escamoso.
Superficial	Pequenos brotamentos de células tumorais basaloides estendendo-se a partir da epiderme.
Nodular	Ilhas sólidas de tumor basaloide.

Fibroepitelioma	Placa vermelha no tronco. Padrão reticular de finas traves de células basaloides anastomosadas em um estroma frouxo com múltiplas conexões com a epiderme.
-----------------	--

Rapini RP. *Dermatopatologia Prática, 2ª Edição. Elsevier; 2018: 271-275.*¹¹

Na prática, muitos tumores apresentam ambos os padrões de baixo e alto risco; infelizmente, não há dados sobre o percentual de cada padrão considerado biologicamente significativo. Portanto, a classificação atual é pragmática, classificando os tumores como de baixo e alto risco; o status de risco tumoral é baseado na variante mais agressiva identificada, independentemente de sua expressividade, contrariando a classificação prévia, que denominava CBC com mais de um subtipo como “mistos”.¹² De fato, Mischczyk *et al.* Reportaram que os subtipos histológicos micronodular, infiltrativo, esclerodermiforme e basoescamoso estão associados a um comportamento mais agressivo, como maiores taxas de recorrência e maior invasão da derme.¹³ Assim, o CBC de alto risco é associado a maior incidência de recidiva local, extensão tumoral subclínica, excisão incompleta e comportamento agressivo.¹⁴

Betti *et al.* descreveram uma associação entre o tipo histológico tumoral, sua topografia e idade de aparecimento. Subtipos superficiais, acometendo principalmente o tronco, foram descritos em indivíduos mais jovens; variantes nodulares, de localização predominantemente facial, foram associadas à idade mais avançada.¹⁵ O subtipo nodular é responsável por metade de todos os

casos de CBC.¹⁶ A prevalência estimada dos demais subtipos de Carcinoma Basocelular está descrita no Quadro 2.

Quadro 2. Prevalência dos Subtipos de Carcinoma Basocelular

Subtipo	Frequência Estimada
Infiltrativo	<10%
Morfeiforme	5-10%
Micronodular	5-15%
Basoescamoso	<2%
Superficial	10-30%
Nodular	50-80%
Fibroepitelioma	<5%

Scrivener et al, 2021¹⁷; Cameron et al, 2019¹⁸; Tanese K, 2019¹⁹.

Infelizmente, a biópsia pré-operatória representa apenas uma amostra do tumor e pode não identificar todas as características histológicas da lesão como um todo. A não detecção de subtipos agressivos pode resultar em subtratamento e recorrência tumoral.²⁰ Em um estudo brasileiro de 2020, a concordância entre o subtipo histológico presente na biópsia incisional e aquele determinado após cirurgia micrográfica de Mohs foi de apenas 45%. Dessa forma, faz-se mister o conhecimento de fatores associados a tumores agressivos e recorrentes previamente à conduta terapêutica.²¹

1.1.4 Tratamento

O tratamento dos CBCs baseia-se nas características do indivíduo (idade, comorbidades, imunossupressão, medicações em uso) e da lesão (tamanho, localização, subtipo, classificação em lesão primária ou recidiva

tumoral). Como mencionado previamente, a biópsia prévia é fundamental para a coleta de informações adicionais sobre a lesão.²²

Ampla gama de tratamentos estão disponíveis, variando de criocirurgia, 5-fluoruracil ou imiquimode tópicos, curetagem e eletrodissecção, excisão cirúrgica e cirurgia micrográfica de Mohs. A exérese cirúrgica e a cirurgia micrográfica de Mohs são as terapias com maiores percentuais de cura clínica; entretanto, nem sempre estão disponíveis ou são apropriadas em casos de idade avançada e comorbidades, por exemplo.²³

Mais recentemente, terapias-alvo contra a via de sinalização *hedgehog*, como o vismodegibe e o sonidegibe, têm obtido excelentes resultados em tumores avançados, múltiplos ou associados a síndromes genéticas, como a síndrome de Gorlin.²⁴

1.2 Alfa-actina

1.2.1 Características gerais

A actina é parte do citoesqueleto, sendo a proteína mais abundante nas células eucarióticas. Participa de mais interações proteína-proteína que qualquer proteína conhecida. Sua capacidade de transitar entre os estados monomérico e filamentosos fazem da actina componente essencial para muitas funções celulares, como a manutenção de seu formato, capacidade de motilidade e polaridade, além de participar ativamente do processo de transcrição. Por suas funções cruciais para a sobrevivência celular, a actina também é alvo de múltiplos patógenos.²⁵

Essa proteína é formada por filamentos e por outras proteínas acessórias e regulatórias. Essas estruturas são o maquinário gerador de força celular, produzindo forças protusas através de polimerização coordenada dos filamentos, ou forças contráteis ao deslizar sobre filamentos bipolares de miosina II. Ambas as forças são fundamentais para a migração celular; a definição e mudança do formato da célula e as propriedades mecânicas de sua superfície; a motilidade intracelular; a morfogênese das organelas de membrana e a adesão intercelular e entre célula e matriz extracelular.²⁶

O citoesqueleto de actina também tem sido estudado por seu papel potencial em doenças neurológicas, progressão e metástases tumorais. Anormalidades na degradação ubiquitina-dependente dos reguladores do citoesqueleto de actina parecem exercer um papel no potencial de propagação de células tumorais, conforme descrito por Ma *et al.*²⁷

Hinz *et al.*²⁸ demonstraram que expressão de alfa-actina de músculo liso (α -AML) é suficiente para expressar características contráteis em fibroblastos, tendo papel, por exemplo, na fase de contração do tecido de granulação durante a cicatrização de feridas. Os fibroblastos ativados dessa forma são chamados de miofibroblastos, e agem por aparato semelhante ao de músculo liso de vasos sanguíneos. Tais fibroblastos são diferentes entre si, podendo expressar níveis variáveis de α -AML. A expressão de α -AML teve efeito diretamente proporcional na capacidade contrátil dessas células. De maneira interessante, o bloqueio do fator de crescimento tumoral beta (TGF- β) reduziu a expressão de α -AML em fibroblastos subcutâneos de murinos.

Além disso, fibroblastos associados a câncer (FACs) são diferentes dos fibroblastos típicos do estroma em termos de sua origem, expressão genética,

secreção de moléculas e efeito em células cancerosas. São extremamente resilientes a estresse celular e adaptáveis a mudanças no ambiente celular²⁹. Assim como os fibroblastos normais, quando em células tumorais ativam-se pela expressão de α -AML e vimentina, agindo conjuntamente na produção e remodelação da matriz extracelular. Podem ter papel no crescimento tumoral, assim como sua estagnação, através de propriedades imunológicas.³⁰

1.2.2 Estudo da imuno-histoquímica

A imuno-histoquímica é processo utilizado na Patologia para localização de expressão de proteínas nos tecidos.³¹ Coons *et al.* primeiro descreveram a técnica em 1941, como forma de detectar antígenos celulares em lâminas de tecido³². Desde então, é utilizada no diagnóstico e pesquisa de doenças infecciosas e neoplásicas. A base da técnica reúne princípios de imunologia, histologia e química, através da união antígeno-anticorpo. Conforme os conceitos de sensibilidade e especificidade foram aprimorados, a técnica também evoluiu. Dessa forma, após a fixação do tecido, o anticorpo selecionado detecta epítomos expostos, formando complexos antígeno-anticorpo que são posteriormente identificados por métodos diretos ou indiretos. Controles positivos e negativos são necessários para precisão técnica, sendo realizados rotineiramente.³³ Para descrição pormenorizada da técnica, conforme é realizada no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), ver Apêndice 7.1.

Dois anticorpos imuno-histoquímicos para actina são comumente descritos: actina músculo-específica e actina de músculo liso (α -AML). A actina

está presente em miofibroblastos, células mioepiteliais, leiomiossarcomas, tumores glômicos, corpos de inclusão de fibromatose digital recorrente, bem como em 50% dos neurotequeomas celulares.³¹ Além disso, a expressão de alfa-actina também foi descrita em tumores cutâneos, conforme descrito na seção 1.2.3.

Os principais marcadores imuno-histoquímicos presentes no CBC estão descritos no Quadro 3.

Quadro 3. Principais Marcadores Imuno-Histoquímicos do Carcinoma Basocelular

Marcador	Função
Ber-EP4	Marcador de células epiteliais não queratinizadas.
Bcl-2	Oncogene envolvido na inibição da apoptose.
CD34	Antígeno de células progenitoras humanas. Presente no tecido conjuntivo ao redor de folículos normais.
CK7	Citoqueratina básica de epitélios simples não queratinizados.

Rapini RP. Dermatopatologia Prática, 2ª Edição. Elsevier; 2018: 417-425.³¹

1.2.3 Alfa-actina e mediadores carcinogênicos do carcinoma basocelular

Os mecanismos de invasão tumoral do CBC são questionados há algumas décadas, com avanços significativos ao longo do tempo. Em 1976, Gabbiani *et al.*³⁴ descreveram um aumento de proteínas contráteis em células tumorais à microscopia eletrônica e imuno-histoquímica, quando comparadas à sua contraparte saudável. Essas proteínas haviam sido descritas previamente em tecidos de reparação de ferimentos e durante a carcinogênese experimental. Contudo, sua significância era desconhecida à época. Em 1988, Kitano³⁵ descreveu um aumento de filamentos de actina em queratinócitos malignos humanos nos carcinomas cutâneos, corroborando os achados prévios.

Majmudar *et al.*³⁶, em 1994, encontraram uma associação entre a invasão tumoral e níveis aumentados da metaloproteinase estromelina-3, e postulou que os espaços intercelulares comumente vistos nos cortes histológicos de CBCs seriam devidos à ação desta enzima, responsável pela propagação do tumor. Uma maior ruptura da membrana basal foi associada a subtipos tumorais mais agressivos. Este dado foi confirmado por estudo de Undén³⁷, dois anos depois, que afirmou que a enzima era produzida por miofibroblastos diferenciados no tecido conjuntivo tumoral.

Ainda nos anos 1990, Tsukamoto *et al.*³⁸ relacionaram um aumento na alfa-actina de músculo liso com subtipos tumorais mais agressivos (sólido, adenoide e esclerosante), com diferenciação dos fibroblastos locais em miofibroblastos no estroma; tais achados são compatíveis com a descrição da não sobrevivência desses carcinomas sem contato com seu estroma.

Mais recentemente, Christian *et al.*³⁹, Law *et al.*⁴⁰ e Piloni *et al.*⁴¹ correlacionaram a presença de alfa-actina de músculo liso com invasão tumoral

no CBC micronodular, nodular-infiltrativo misto, morfeiforme e queratótico, respectivamente. Zheng *et al.*⁴² descreveram o carcinoma basocelular com diferenciação mioepitelial, consolidando o conhecimento prévio.

O interesse em marcadores tumorais deve-se ao diagnóstico cada vez mais precoce dessas lesões. Comprovando-se a relação entre o aumento de alfa-actina e uma maior invasão tumoral, poder-se-ia prever o comportamento de um carcinoma basocelular de invadir os tecidos locais, auxiliando na decisão terapêutica de intervenções mais ou menos conservadoras, como margens histológicas mais amplas ou um tempo de seguimento mais longo, por exemplo. Esse conhecimento poderá ser reconhecido como de importante valor.

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Soyer HP, Rigel DS, McMeniman E. *Actinic Keratosis, Basal Cell Carcinoma, and Squamous Cell Carcinoma*. In: Bologna J, Schaeffer JV, Cerroni L, eds. *Dermatology 4th Edition*. Elsevier; 2018: 1872–1892.
2. de Vries et al. *Rapid and continuous increases in incidence rates of basal cell carcinoma in the southeast Netherlands since 1973*. *J Invest Dermatol* 2004;123:634-638.
3. Chinem VP, Miot HA. *Epidemiologia do Carcinoma Basocelular*. *An Bras Dermatol*. 2011;86(2):292-305
4. Inca.gov.br [Internet]. *Câncer de pele não melanoma*. Acesso em: 11/07/2018.
5. Tanese K. *Diagnosis and Management of Basal Cell Carcinoma*. *Curr Treat Options Oncol.*, 20 (2019), 13.
6. Kuo et al. *Correlates of multiple basal cell carcinoma in a retrospective cohort study: Sex, histologic subtypes, and anatomic distribution*. *J Am Acad Dermatol.*, 77 (2017), 233-234
7. Armstrong BK, Kricger A. *The epidemiology of UV induced skin cancer*. *J Photochem Photobiol B* 2001;63:8-18.
8. Rubin AI, Chen, EH. Ratner D. *Basal-cell carcinoma*. *N Engl J Med*, 353 (2005), 2262-2269.
9. Lang et al. *S2k Guidelines for Cutaneous Basal Cell Carcinoma - Part 1: Epidemiology Genetics and Diagnosis*. *J Dtsch Dermatol Ges*, 17 (2019), 94-103

10. Lara et al. *Recurrence rate of basal cell carcinoma with positive histopathological margins and related risk factors*. An Bras Dermatol., 92 (2017), 58-62
11. Rapini RP. *Dermatopatologia Prática, 2ª Edição*. Elsevier; 2018: 271-275.
12. Slater D, Walsh M. *Standards and datasets for reporting cancers: Dataset for the histological reporting of primary cutaneous basal cell carcinoma*, May 2014. The Royal College of Pathologists. Disponível em: < <http://www.rcpath.org>>. Acesso em: 11/07/2018.
13. Miszczyk et al. *Incomplete excision of basal cell carcinoma (BCC) in the head and neck region: to wait, or not to wait?*. Postepy Dermatol Alergol., 34 (2017), 607-611
14. Perera et al. *Incidence and prevalence of non-melanoma skin cancer in Australia: A systematic review*. Australas J Dermatol., 56 (2015), 258-267
15. Betti R et al. *Anatomic Location of Basal Cell Carcinomas May Favor Certain Histologic Subtypes*. J Cutan Med Surg. 2010 Nov-Dec;14(6):298-302. doi: 10.2310/77502010.09081.
16. Kimyai-Asadi A, Goldberg LH, Jih MH. *Accuracy of serial transverse cross-sections in detecting residual basal cell carcinoma at the surgical margins of an elliptical excision specimen*. J Am Acad Dermatol., 53 (2005), -474
17. Scrivener Y, Grosshans E, Cribier B. *Variations of basal cell carcinomas according to gender, age, location and histopathological subtype*. Br J Dermatol . 2002 Jul;147(1):41-7. doi: 10.1046/j.1365-2133.2002.04804.x.

18. Cameron et al. *Basal cell carcinoma: Epidemiology; pathophysiology; clinical and histological subtypes; and disease associations*. J Am Acad Dermatol. 2019 Feb;80(2):303-317. doi: 10.1016/j.jaad.2018.03.060. Epub 2018 May 18.
19. Tanese K. *Diagnosis and Management of Basal Cell Carcinoma*. Curr Treat Options Oncol. 2019 Feb 11;20(2):13
20. Kimyai-Asadi et al. *Efficacy of narrow-margin excision of well-demarcated primary facial basal cell carcinomas*. J Am Acad Dermatol., 53 (2005), pp. 464-468
21. Cerci FB, Kubo EM, Werner B. *Comparison of basal cell carcinoma subtypes observed in preoperative biopsy and Mohs micrographic surgery*. An Bras Dermatol. Sep-Oct 2020;95(5):594-601. doi: 10.1016/j.abd.2020.04.005.
22. Bichakjian CK et al. *Basal Cell Skin Cancer, Version 1.2016, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology*. J Natl Compr Canc Netw. 2016;14(5):574.
23. Cameron MC et al. *Basal cell carcinoma: Contemporary approaches to diagnosis, treatment, and prevention*. J Am Acad Dermatol. 2019;80(2):321.
24. Dréno B et al. *Two intermittent vismodegib dosing regimens in patients with multiple basal-cell carcinomas (MIKIE): a randomised, regimen-controlled, double-blind, phase 2 trial*. Lancet Oncol. 2017;18(3):404.
25. Dominguez R, Holmes KC. *Actin structure and function*. Annu Rev Biophys. 2011;40:169-86. doi: 10.1146/annurev-biophys-042910-155359.

26. Svitkina T. *The Actin Cytoskeleton and Actin-Based Motility*. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2018 Jan 2;10(1):a018267. doi: 10.1101/cshperspect.a018267.
27. Ma et al. *Ubiquitination and Long Non-coding RNAs Regulate Actin Cytoskeleton Regulators in Cancer Progression*. Int J Mol Sci. 2019 Jun 19;20(12):2997. doi: 10.3390/ijms20122997.
28. Hinz et al. *Alpha-smooth muscle actin expression upregulates fibroblast contractile activity*. Mol Biol Cell. 2001 Sep;12(9):2730-41. doi: 10.1091/mbc.12.9.2730.
29. Kalluri R. *The biology and function of fibroblasts in cancer*. Nat Rev Cancer. 2016;16(9):582–598.
30. Nomura S. *Identification, Friend or Foe: Vimentin and α -Smooth Muscle Actin in Cancer-Associated Fibroblasts*. Ann Surg Oncol. 2019 Dec;26(13):4191-4192. doi: 10.1245/s10434-019-07894-8.
31. Rapini RP. *Dermatopatologia Prática, 2ª Edição*. Elsevier; 2018: 417-425.
32. Coons AH, Creech HJ, Jones RN: *Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group*. Proc Soc Exp Biol Med 47:200–202, 1941
33. Ramos-Vara JA. *Technical aspects of immunohistochemistry*. Vet Pathol. 2005 Jul;42(4):405-26. doi: 10.1354/vp.42-4-405.
34. Gabbiani G, Csank-Brassert J, Schneeberger JC, Kapanci Y, Trenchev P, Holborow J. *Contractile Proteins in Human Cancer Cells*. Am J Pathol. 1976 Jun;83(3):457-474.

35. Kitano Y. *Distribution of Actin Filaments in Human Malignant Keratinocytes*. Cell Biol Int Rep. 1988 Mar;12(3):189-194.
36. Majmudar G, Nelson BR, Jensen TC, Voorhees JJ, Johnson TM. *Increased Expression of Stromelysin-3 in Basal Cell Carcinomas*. Mol Carcinog. 1994 Jan;9(1):17-23.
37. Undén AB, Sandstedt B, Bruce K, Hedblad MA, Bäckdahl MS. *Stromelysin-3 mRNA Associated with Myofibroblasts Is Overexpressed in Aggressive Basal Cell Carcinoma and in Dermatofibroma but Not in Dermatofibrosarcoma*. J Invest Dermatol. 1996 Aug;107(2):147-153.
38. Tsukamoto H, Hayashibe K, Mishima Y, Ichihashi M. *The altered expression of α -smooth muscle actin in basal cell epithelioma and its surrounding stroma: with special reference to proliferating cell nuclear antigen expression and adenoid differentiation*. Br J Dermatol. 1994 Feb;130(2):189-194.
39. Christian MM, Moy RL, Wagner RF, Yen-Moore A. *A Correlation of Alpha-Smooth Muscle Actin and Invasion in Micronodular Basal Cell Carcinoma*. Dermatol Surg. 2001 May;27(5):441-445.
40. Law AM, Oliveri CV, Pacheco-Quinto X, Horenstein MG. *Actin expression in purely nodular versus nodular-infiltrative basal cell carcinoma*. J Cutan Pathol. 2003 Apr;30(4):232-236.
41. Pilloni L, Bianco P, Manieli C, Senes G, Coni P, Atzori L, Aste N, Faa G. *Immunoreactivity for alpha-smooth muscle actin characterizes a potentially aggressive subgroup of little basal cell carcinomas*. Eur J Histochem. 2009 Apr-Jun;53(2):113-116.

42. Zheng S, Guo Y, Mones JM. *Basal cell carcinoma with myoepithelial differentiation*. Am J Dermatopathol. 2011;33:863–866.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral: verificar a prevalência da expressão imuno-histoquímica da alfa-actina em carcinomas basocelulares de baixo risco (superficial, nodular, fibroepitelioma) e de alto risco (infiltrativo, morfeiforme, basoescamoso, esclerosante e micronodular).

3.2 Específico: descrever a relação entre a expressão imuno-histoquímica da alfa-actina e as seguintes variáveis:

- a) idade do paciente;
- b) topografia da lesão;
- c) tamanho da lesão;
- d) espessura tumoral;
- e) presença de ulceração;
- f) recidiva das lesões em 5 anos (quando disponível).

4. ARTIGO CIENTÍFICO REDIGIDO EM INGLÊS

“Stromal α -smooth muscle actin positivity is associated with high-risk basal cell carcinomas”

Ana Carolina Krum dos Santos, Darlan Lima, Renato Marchiori Bakos, André da Silva Cartell, Renan Rangel Bonamigo

Aceito para publicação pela Revista American Journal of Dermatopathology.

Title Page

Title: Stromal α -smooth muscle actin positivity is associated with high-risk basal cell carcinomas

Authors: Ana Carolina Krum dos Santos¹, Darlan Lima², Renato Marchiori Bakos³, André da Silva Cartell³, Renan Rangel Bonamigo^{1,3,4}

Author Information:

1. Dermatologist
2. Medical Student - Universidade Federal do Rio Grande do Sul
3. Professor - Faculty of Medicine / Universidade Federal do Rio Grande do Sul / Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil
- 4 Post-Graduation Program In Pathology of Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Brazil

Dermatology and Pathology Departments, HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE (2350 Ramiro Barcelos St. - Santa Cecilia, Porto Alegre - RS, 90035-903)

Corresponding Author:

Ana Carolina Krum dos Santos

E-mail: anakrum@pm.me

Address: 2350 Ramiro Barcelos St. - Santa Cecilia, Porto Alegre - RS, Brazil

Zip Code: 90035-903

Phone Number: +5551 33598570 / +5551 984382009

ORCID 0000-0001-9863-1836

Disclosure statement: The authors have no conflicts of interest to disclose. All authors have contributed significantly to this publication.

Funding: Fundo de Incentivo à Pesquisa (FIPE) – Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA)

Abstract: The presence of myofibroblast differentiation has been proposed as an invading mechanism in basal cell carcinomas. However, small studies regarding α -smooth muscle actin positivity have led to conflicting results. This review of 100 cases examines the association between α -smooth muscle actin positivity on immunohistochemical studies and the clinical and histopathological characteristics of the tumor, including tumor size, thickness, subtype, topography, ulceration, 5-year recurrence rate and age at diagnosis.

Keywords: Basal cell carcinoma, Smooth muscle actin, Prognosis, Stroma, Myofibroblast

Manuscript:

Introduction

Basal cell carcinoma (BCC) is a common skin cancer that is locally invasive, but rarely metastasizes.¹ Case series have proposed a role for α -smooth muscle actin (α -SMA) expression in skin carcinomas through a fibroblast to myofibroblast differentiation, thus possibly contributing to their invasive mechanisms.²⁻⁶ Protein microfilaments have been visualized in electron microscopy studies since as early as 1976 in squamous cell carcinomas and other skin neoplasms.⁷⁻⁸

Proving the relationship between α -smooth muscle actin expression and tumor invasion could help predict a tendency for BCCs to spread locally, thus helping in therapeutic decision.

The aim of this study was to describe the expression of α -smooth muscle actin immunohistochemical (IHC) staining in low risk or non-aggressive subtypes (superficial, nodular, fibroepithelioma) and high risk or aggressive subtypes (infiltrative, morpheaform, basosquamous, micronodular) basal cell carcinomas.

Materials and Methods

The study group comprised 100 sample tumors excised in one year at the same institution (Hospital de Clínicas de Porto Alegre). Registry records were obtained for

the following data: patient's age, tumor location (sun exposed versus non exposed), tumor subtype (according to the Royal College of Pathologists 2014 criteria⁹), tumor size and thickness, presence or absence of ulceration and 5-year clinical recurrence proven by biopsy.

Subsequently, the paraffin samples were stained with α -smooth muscle actin (Merck-Millipore ASM-1 clone) and analyzed for positivity in tumor cells and tumor stroma. We used a semiquantitative scale of 0–4, where a score of 0 indicates no actin expression; a score of 1 indicated actin expression in 0–25% of tumor cells; a score of 2 indicated actin expression in 25–50% of tumor cells; a score of 3 indicated actin expression in 50–75% of tumor cells; and a score of 4 indicated actin expression in 75–100% of tumor cells. The score was usually in the 2+ to 4+ range. Immunohistochemistry evaluations were performed by a dermatopathologist expert (ASC).

Statistical analysis was performed using chi-square test for each of the categorical values. When chi-square test was not applicable due to a smaller sample size, Fischer's exact test was performed. A significant index $\alpha < 0.05$ was applied to all analysis. Association between variables was calculated using phi (ϕ) for 2x2 tables, or Cramer's V test, for tables larger than 2x2. Odds ratio was applied to significant categories. All statistical procedures were performed according to Field's (2013) recommendations, using IBM SPSS Statistics version 23.0 software.

Results

The characteristics of the sample are summarized in **Table 1** and **Table 2**. Most tumors found were non-aggressive; most patients were older than 60 years old; and most lesions were sun exposed. Most tumors were greater than 2 mm thick, but smaller than 2 cm wide. Recurrence rates were low, when available in registry; and there was a slight preponderance of non-ulcerated lesions over ulcerated lesions (58% versus 42%).

There was a statistically significant correlation between stromal α -smooth muscle actin positivity and aggressive subtypes of BCC ($p = 0.001$, $\phi = 0.34$) (Table 2). The association between the positivity in the stroma and the recurrence rate was of 1.8 (*odds ratio* = 1.896 IC95% = 0.771 – 4.659). Other tumor characteristics (tumor thickness, location, ulceration, and size) and age group were not significantly related to immunohistochemical positivity to α -smooth muscle actin (**Table 3**).

There was no statistically significant correlation between tumor cell α -smooth muscle actin positivity and any of the tumor characteristics and age group (**Table 4**).

Examples of tumor cell and stromal α -SMA staining are displayed in **Figure 1**.

Discussion

Our results are consistent with those of previous, smaller studies. We also expanded the topic, including analysis of other potential factors associated with α -SMA positivity, such as age, location, thickness and recurrence rates. The results are congruent with the proposed mechanism of tissue invasion in skin carcinomas: stromal fibroblasts express contractile proteins, thus acquiring a myoepithelial differentiation, while tumor cells have no proposed role in this phenomenon. Invasive mechanisms in basal cell carcinomas likely involve motility and progression through tissue, as well as metalloproteinases expression by stromal tissue.¹⁰ This “cutting and invading” proposed tool is expressed in high-risk BCCs, explaining its aggressive clinical behavior and higher recurrence rate.

Adegboyega *et al*¹¹ demonstrated a higher α -SMA expression in stromal BCC cells located in the head and neck area. Despite a higher prevalence of superficial subtypes in the trunk¹², there was no statistical difference regarding topography in this study. This finding could be due to a smaller sample in non-photo exposed areas, reflecting the epidemiology of the tumor. There were also limitations in this study regarding recurrence data, as patients could be discharged or miss clinical appointments after surgery and lesion clearance.

Therefore, α -SMA immuno-histochemistry is a promising ancillary method for the detection of potentially invasive and recurrent BCCs, as incisional biopsy samples usually do not reflect the entire tumor's classification. This method could prove useful when evaluating lesions in central areas of the face, when Mohs surgery is not available, especially when a skin flap is required to approach the resulting wound.

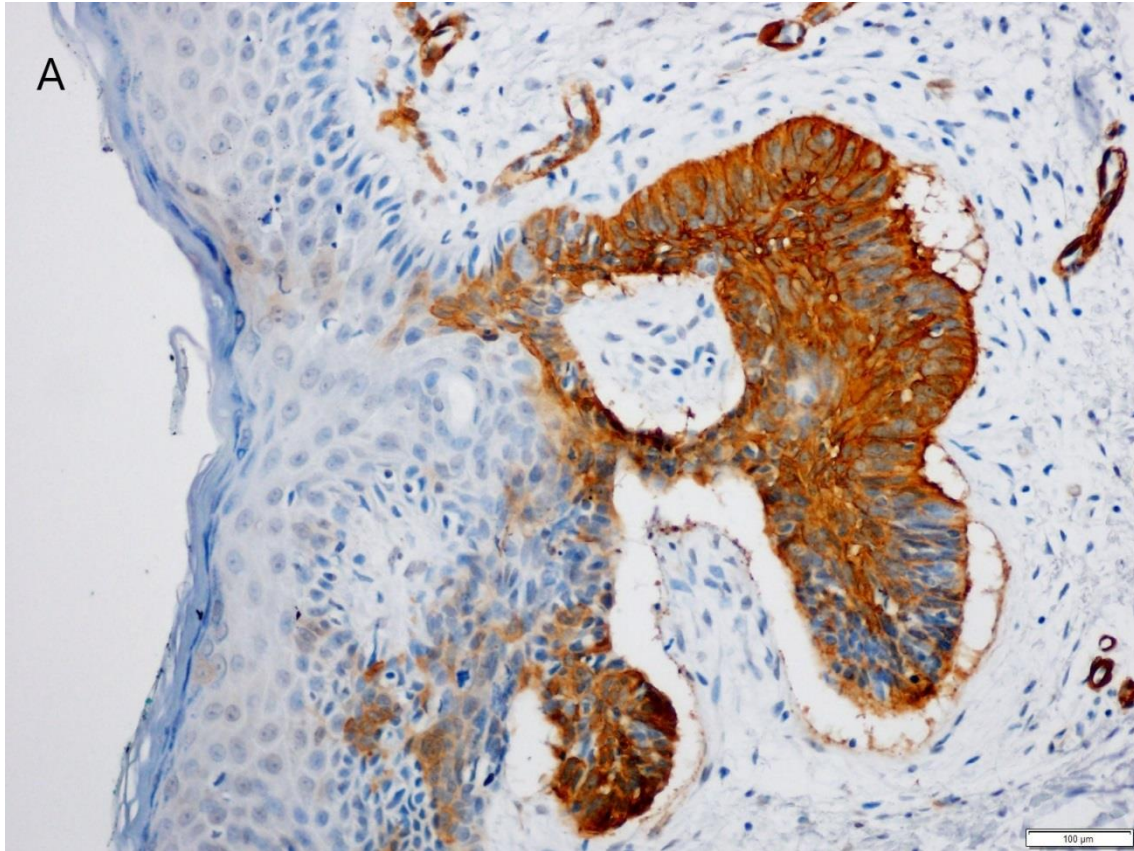
References

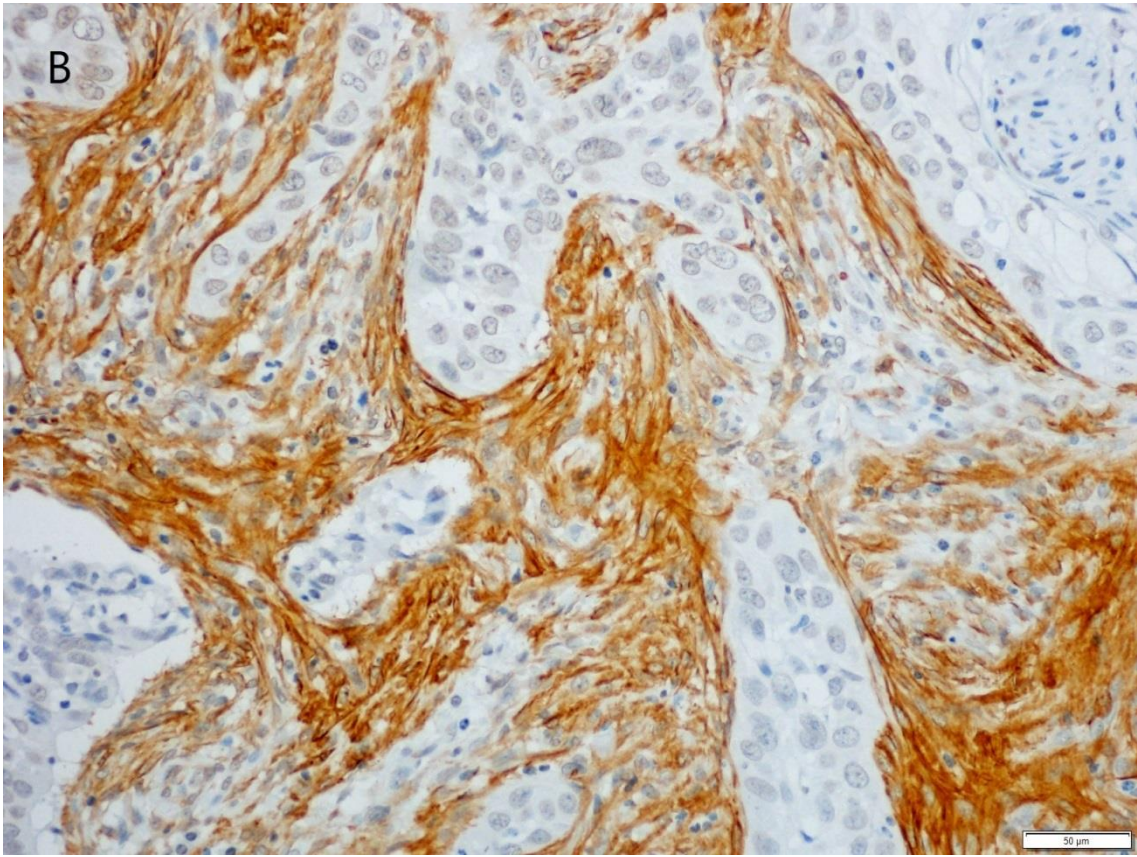
1. Soyer HP, Rigel DS, McMeniman E. Actinic keratosis, basal cell carcinoma, and squamous cell carcinoma. In: Bologna J, Schaeffer JV, Cerroni L, eds. *Dermatology* 4th Edition. Elsevier; 2018:1872–1892.
2. Undén AB, Sandstedt B, Bruce K, Hedblad MA, Bäckdahl MS. Stromelysin-3 mRNA associated with myofibroblasts is overexpressed in aggressive basal cell carcinoma and in dermatofibroma but not in dermatofibrosarcoma. *J Invest Dermatol.* 1996 Aug;107(2):147-153.
3. Tsukamoto H, Hayashibe K, Mishima Y, Ichihashi M. The altered expression. of α -smooth muscle actin in basal cell epithelioma and its surrounding stroma: with special reference to proliferating cell nuclear antigen expression and adenoid differentiation. *Br J Dermatol.* 1994 Feb;130(2):189-94.
4. Christian MM, Moy RL, Wagner RF, Yen-Moore A. A correlation of alpha-smooth muscle actin and invasion in micronodular basal cell carcinoma. *Dermatol Surg.* 2001 May;27(5):441-445.
5. Law AM, Oliveri CV, Pacheco-Quinto X, Horenstein MG. Actin expression in purely nodular versus nodular-infiltrative basal cell carcinoma. *J Cutan Pathol.* 2003 Apr;30(4):232-236.
6. Pilloni L, Bianco P, Manieli C, Senes G, Coni P, Atzori L, Aste N, Faa G. Immunoreactivity for alpha-smooth muscle actin characterizes a potentially aggressive subgroup of little basal cell carcinomas. *Eur J Histochem.* 2009 Apr-Jun;53(2):113-116.
7. Gabbiani G, Csank-Brassert J, Schneeberger JC, Kapanci Y, Trenchev P, Holborow J. Contractile proteins in human cancer cells. *Am J Pathol.* 1976 Jun;83(3):457-474.

8. Kitano Y. Distribution of actin filaments in human malignant keratinocytes. *Cell Biol Int Rep.* 1988 Mar;12(3):189-194.
9. Slater D, Walsh M. Standards and data sets for reporting cancers: Dataset for the histological reporting of primary cutaneous basal cell carcinoma, May 2014. The Royal College of Pathologists. Available in: <<http://www.rcpath.org>>. Access in: 11/07/2018.
10. Majmudar G, Nelson BR, Jensen TC, Voorhees JJ, Johnson TM. Increased expression of stromelysin-3 in basal cell carcinomas. *Mol Carcinog.* 1994 Jan;9(1):17-23.
11. Adegboyega PA, Rodriguez S, McLarty J. Stromal expression of f actin is a marker of aggressiveness in basal cell carcinoma. *Hum Pathol.* 2010 Aug;41(8):1128-1137.
12. Betti R, Radaelli G, Bombonato C, Crosti C, Cerri A, Menni S. Anatomic location of basal cell carcinomas may favor certain histologic subtypes. *J Cutan Med Surg.* 2010 Nov-Dec;14(6):298-302.

Figures

Figure 1. Expression of α -SMA by tumor cells and stromal cells in BCC. A. Superficial BCC showing positive α SMA expression in tumor cells. B. Nodular-Infiltrative BCC with marked expression of α -SMA in stromal cells. (Magnifications: A and B, $\times 20$).





Tables

Table 1. Basal Cell Carcinomas: clinical and histopathological characteristics

TUMOR CHARACTERISTICS	RESULTS (N)
SUBTYPE	Aggressive (n=27)
	Non Aggressive (n=73)
AGE (YEARS)	<60 (n=27)
	60-80 Years Old (n=57)
	>80 (n=16)
LOCATION	Sun Exposed (n=83)
	Non Exposed (n=17)
TUMOR SIZE	<2 cm (n=81)
	>2 cm (n=18)
THICKNESS	<1 mm (n=7)
	1-2 mm (n=22)
	>2 mm (n=40)
ULCERATION	Ulcerated (n=42)
	Non Ulcerated (n=58)
RECURRENCE	Present (n=22)
	Absent (n=78)

Table 2. Basal Cell Carcinomas: specific subtypes

Subtype	Results (n)
Infiltrative	20
Morpheaform	1
Micronodular	3
Basosquamous	3
Superficial	7
Nodular	
Solid	45
Cystic	12
Adenoid	8
Keratotic	1
Fibroepithelioma	0

Table 3. Descriptive results and the association between stromal α -smooth muscle actin and tumor characteristics.

Tumor characteristics		α -smooth muscle actin	
		Positive n (%)	Negative n (%)
Subtype	Aggressive (n=27)	16 (59%)	11 (41%)
	Non Aggressive(n=73)	17 (23%)	56 (77%)
	(p; $X^2(1)$; ϕ)	(0.001* ; 11.535; 0.34)	
Age (years)	<60 (n=27)	8 (30%)	19 (70%)
	60-80 (n=57)	18 (32%)	39 (68%)
	>80 (n=16)	7 (44%)	9 (56%)
	(p; $X^2(2)$; V)	(0.585; 1.027; 0.101)	
Tumor location	Sun exposed (n=83)	26 (31%)	57 (69%)
	Non exposed (n=17)	7 (41%)	10 (59%)
	(p; $X^2(1)$; ϕ)	(0.302; 0.619; -0.079)	
Tumor size	<2 cm (n=81)	24 (30%)	57 (70%)
	>2 cm (n=18)	9 (50%)	9 (50%)
	(p; $X^2(1)$; ϕ)	(0.085; 2.75; -0.167)	
Thickness	<1 mm (n=7)	2 (29%)	5 (71%)
	1-2 mm (n=22)	4 (18%)	18 (82%)
	>2 mm (n=40)	18 (45%)	22 (55%)
	(p(f); $X^2(2)$; V)	(0.099; 4.633; 0.259)	
Ulceration	Ulcerated (n=42)	18 (43%)	24 (57%)
	Non ulcerated (n=58)	15 (26%)	43 (74%)
	(p; $X^2(1)$; ϕ)	(0.494; 0.051; -0.023)	
Recurrence	Present (n=22)	7 (32%)	15 (68%)
	Absent (n=78)	26 (33%)	52 (67%)
	(p; $X^2(1)$; ϕ)	(0.555; 0.018; -0.013)	

p: p value in chi-square test; p(F): p value for Fisher's Exact Test when a count over 5 was not confirmed. $\chi^2(l_d)$: indicates the chi-square value found in each test for a given number of liberty degrees; ϕ : phi association index for 2x2 tables; V: Cramer's V index for non- 2x2 tables. *indicates p<0.05.

Table 4. Descriptive results and the association between tumor cell α -smooth muscle actin and tumor characteristics.

Tumor characteristics		α -smooth muscle actin	
		Positive n (%)	Negative n (%)
Subtype	Aggressive (n=27)	13 (48%)	14 (52%)
	Non Aggressive (n=73)	24 (33%)	49 (67%)
	(p; $X^2(1)$; ϕ)	(0.121; 1.972; 0.14)	
Age (years)	<60 (n=27)	11 (41%)	16 (59%)
	60-80 (n=57)	23 (40%)	34 (60%)
	>80 (n=16)	3 (19%)	13 (81%)
	(p; $X^2(2)$; V)	(0.289; 2.723; 0.165)	
Tumor location	Sun Exposed (n=83)	33 (40%)	50 (60%)
	Non exposed (n=17)	4 (24%)	13 (76%)
	(p; $X^2(1)$; ϕ)	(0.162; 1.594; 0.126)	
Tumor size	<2 cm (n=81)	29 (36%)	52 (64%)
	>2 cm (n=18)	7 (39%)	11 (61%)
	(p; $X^2(1)$; ϕ)	(0.503; 0.061; -0.025)	
Thickness	<1 mm (n=7)	2 (29%)	5 (71%)
	1-2 mm (n=22)	9 (41%)	13 (59%)
	>2 mm (n=40)	14 (35%)	
	(p(f); $X^2(2)$; V)	(0.872; 0.412; 0.077)	
Ulceration	Ulcerated (n=42)	15 (36%)	27 (64%)
	Non ulcerated (n=58)	22 (38%)	36 (62%)
	(p; $X^2(1)$; ϕ)	(0.494; 0.051; -0.023)	
Recurrence	Present (n=22)	8 (36%)	14 (64%)
	Absent (n=78)	29 (37%)	49 (63%)
	(p; $X^2(1)$; ϕ)	(0.576; 0.005; -0.007)	

p: p value in chi-square test; p(F): p value for Fisher's Exact Test when a count over 5 was not confirmed. $\chi^2(l_d)$: indicates the chi-square value found in each test for a given number of liberty degrees; ϕ : phi association index for 2x2 tables; V: Cramer's V index for non- 2x2 tables. *indicates p<0.05.

5. CONCLUSÕES

O estudo verificou que a maioria dos pacientes possuía idade de 60 anos ou superior e a maior parte das lesões estava localizada em área fotoexposta. A maioria dos tumores analisada foi classificada como não agressiva, tinha espessura superior a 2 milímetros, mas era inferior a 2 cm de diâmetro. As taxas de recidiva foram baixas, quando disponíveis em prontuário; e havia um equilíbrio entre lesões ulceradas e não ulceradas.

Houve associação estatisticamente significativa entre positividade para alfa-actina de músculo liso no estroma tumoral e subtipos agressivos ($p=0,001$, $\phi = 0,34$). A associação entre a positividade estromal e o risco de recidiva foi de 1.8 (*odds ratio* = 1,896 IC95% = 0,771 – 4,659). Outras características tumorais (espessura tumoral, localização, ulceração e tamanho do tumor) não foram significativamente associadas à presença de alfa-actina de músculo liso à imuno-histoquímica.

Não houve associação estatisticamente significativa entre a positividade para alfa-actina nas células tumorais e as variáveis estudadas.

Nossos resultados são condizentes com aqueles verificados em estudos menores, com expansão para análise de outros possíveis fatores associados a maior agressividade tumoral. Os resultados foram congruentes com o mecanismo proposto de invasão do CBC, ou seja, proteínas contráteis expressas em fibroblastos, diferenciados portanto em miofibroblastos, levam à expansão do estroma tumoral, com ação de metaloproteinases para clivagem dos tecidos saudáveis adjacentes. Essa característica do estroma tumoral parece ser mais significativa em subtipos de alto risco, como carcinomas

infiltrativos e morfeiformes, sendo condizente com a característica clínica de crescimento e prevalência de recidiva dessas lesões.

Em relação à localização das lesões, embora haja predomínio de subtipos superficiais no tronco, não foi encontrada associação entre a localização das lesões e a prevalência de positividade para α -SMA. Contudo, havia menor número de amostras em localizações não fotoexpostas, refletindo a epidemiologia do tumor. Da mesma forma, alguns dados, como índice de recidiva, não estavam disponíveis em dados de prontuário, devido à perda de acompanhamento ou alta previamente aos 5 anos de acompanhamento.

Dessa forma, a imuno-histoquímica para α -SMA é um método ancilar promissor para a detecção de CBCs potencialmente invasivos e recidivantes, visto que a biópsia incisional pode não refletir a classificação real do tumor (por exemplo, biopsiando-se área nodular em um carcinoma posteriormente classificado como infiltrativo). Esse método pode ser de grande utilidade para avaliar lesões de alto risco na região central da face, quando a cirurgia de Mohs estiver indisponível, especialmente quando do planejamento de fechamento cirúrgico por enxerto ou retalho, diminuindo-se, portanto, a quantidade de procedimentos cirúrgicos e o risco de perda de enxertia.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O Serviço de Dermatologia e o Serviço de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre são centros de referências no diagnóstico de pacientes com carcinomas basocelulares e de outros tumores de pele, doenças muito frequentes na prática clínica dermatológica.

Embora de modelo transversal sem pareamento, o presente estudo reflete a epidemiologia dos carcinomas basocelulares atendidos no ano de 2014 nessa instituição, refletindo a prevalência dos diferentes subtipos tumorais na população atendida, advinda sobretudo de Porto Alegre, da Região Metropolitana e do interior do Rio Grande do Sul.

Dessa forma, estudos que busquem o entendimento dos mecanismos de invasão tumoral do câncer de pele mais prevalente podem ajudar no aprimoramento do planejamento e da técnica cirúrgica, visando a prevenção da recidiva tumoral e um menor número de intervenções para alcançar-se a cura clínica e histológica da lesão.

7. APÊNDICES

7.1 TÉCNICA DE IMUNO-HISTOQUÍMICA

Os espécimes fixados em formalina tamponada 10%, processados e incluídos em parafina, foram submetidos ao corte histológico em micrótomo regulado para a espessura de 4 μm . Os cortes foram posicionados em lâminas previamente silanizadas.

Para proceder à técnica de imuno-histoquímica, as lâminas foram aquecidas em estufa a 80°C por 30 minutos, desparafinizadas em xilol, reidratadas em álcool etílico e posteriormente em água destilada.

A recuperação antigênica foi realizada em banho-maria por 20 minutos a 95°C no tampão citrato pH 6,0. A atividade de peroxidase endógena foi bloqueada com solução de peróxido de hidrogênio a 5% em metanol por 20 minutos. O bloqueio de proteínas foi realizado com leite desnatado em pó diluído a 5% em PBS por 20 minutos. Os cortes foram posteriormente incubados *overnight* em geladeira de 2 a 8°C, com o anticorpo primário ASM-1 SDS Merck na diluição 1:50. Após a incubação, foi aplicado o anticorpo secundário, incubado a 1h e 30 minutos em temperatura ambiente; a visualização da reação foi obtida com *Liquid Dab* (Dako, K3468), conforme recomendações do fabricante.

Após a visualização, as lâminas foram contra-coradas em hematoxilina de Harris por 10 segundos, e diferenciadas em água amoniacal 2% por 30 segundos. Os cortes foram desidratados em etanol absoluto e colocados em xilol para a montagem das lâminas em resina do tipo *Entellan*.

7.2 FICHA DE AVALIAÇÃO

Idade:

Prontuário:

Número do AP:

Descrição clínica e dermatoscópica da lesão:

Tamanho da lesão: ___ mm () não disponível

Topografia: () fotoexposta () não fotoexposta

Ulceração: () presente () ausente

Impressão diagnóstica (clínica):

Recidiva da lesão: () sim () não () não disponível

Tipo histológico (segundo critérios atualizados do *Royal College of Pathology*):

() infiltrativo () sólido () de padrão reticular

() nodular () sólido cístico () outro:

() superficial () adenoide

Ulceração (patologia): () não ulcerado () ulcerado (>3 mm) () ulcerado (<3mm)

Estendendo-se ao: () derma papilar () derma reticular superior () derma reticular médio () derma reticular profundo () hipoderma

Espessura tumoral: () <1 mm () 1-2 mm () >2mm

Paliçada: () bem expressa () pouco expressa () moderadamente expressa () não apresentando paliçada periférica

Padrão de crescimento: () expansivo () infiltrativo

Bloco com bordas: () arredondadas () espiculadas

Estroma tumoral: () fibroso () mucinoso () escasso

Infiltrado linfocitário: () discreto () moderado () acentuado

Limites cirúrgicos radiais: () livres () exíguos () comprometidos

Sendo que o mais próximo dista ____ milímetros pós-fixação.

Limite cirúrgico profundo: () livre () comprometido

Coloração para alfa-actina de músculo liso: () positiva () negativa

8. ANEXOS

8.1. Parecer do Comitê de Ética da UFCSPA

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: A Expressão Imuno-Histoquímica da Actina nos Carcinomas

Basocelulares **Pesquisador:** Renan Rangel Bonamigo **Área Temática:**

Versão: 2

CAAE: 99227218.2.0000.5345

Instituição Proponente: Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Patrocinador Principal: FUNDACAO INSTITUTO DE PESQUISAS ECONOMICAS FIPE

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.092.253

Apresentação do Projeto:

O carcinoma basocelular é extremamente prevalente na população em geral, acarretando prejuízos clínicos, funcionais e estéticos ao paciente e onerando os Serviços de Saúde. A determinação do potencial invasor tumoral é de grande valia para decisões terapêuticas mais acuradas, levando-se em consideração as condições clínicas de cada paciente. Observamos uma carência na literatura de estudos avaliando, de uma forma integral, a relação entre a presença de filamentos de actina e marcadores de agressividade ao quadro clínico e à histopatologia.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Descrever a prevalência da positividade para actina, à imuno-histoquímica, em carcinomas basocelulares de baixo risco (superficial, nodular, fibroepitelioma) e de alto risco (infiltrativo, morfeiforme, basoescamoso, esclerosante e micronodular).

Objetivo Secundário:

Descrever a relação entre a positividade para actina, à imuno-histoquímica, e as seguintes variáveis: idade do paciente; topografia; padrão clínico da lesão; descrição dermatoscópica; tamanho da lesão, espessura tumoral; presença de ulceração e recidiva das lesões em 5 anos (quando disponível).

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: os pesquisadores informam que não há riscos.

Endereço: Rua Sarmento Leite ,245

Bairro: Sarmento

CEP: 90.050-170

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3303-8804

E-mail: cep@ufcspa.edu.br

Benefícios:

Comprovando-se a relação entre o aumento de actina e uma maior invasão tumoral, poderíamos prever o comportamento de um carcinoma basocelular de invadir os tecidos locais, auxiliando na decisão terapêutica de intervenções mais ou menos conservadoras, como margens histológicas mais amplas ou um tempo de seguimento mais longo, por exemplo. Esse conhecimento poderá ser reconhecido como de importante valor.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Serão identificados e avaliados 100 blocos de parafina de pacientes cuja exérese de carcinoma basocelular tenha ocorrido no ano de 2014.

Esse material será processado como lâminas em H&E, identificando-se os tipos histológicos presentes e a espessura tumoral máxima. No Centro de Pesquisa Experimental do HCPA, serão coradas as lâminas conforme a técnica padronizada de imuno-histoquímica. O material será analisado quanto à positividade ou negatividade para esta coloração. Serão verificadas nos prontuários dos pacientes: idade; topografia da lesão (área fotoexposta ou não fotoexposta); padrão clínico da lesão (impressão clínica de CBC superficial, nodular ou infiltrativo); descrição dermatoscópica; espessura tumoral; presença ou ausência de ulceração e recidiva da lesão em até 5 anos de acompanhamento.

Será realizado estudo descritivo, por se tratar de análise inédita na literatura.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O termo de compromisso de utilização dos dados foi enviado e está adequado. Os pesquisadores se comprometem em garantir o sigilo dos participantes.

Demais termos já haviam sido enviados anteriormente e estão adequados.

Recomendações:

Orientamos que em futuros projetos o nome do pesquisador responsável nos termos de anuência, de entrega de relatórios, etc, deve ser do professor com vínculo institucional à UFCSPA, e não do aluno de pós - graduação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

As pendências foram resolvidas. Projeto considerado aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

De acordo com o parecer do relator.

Endereço: Rua Sarmento Leite ,245

Bairro: Sarmento

CEP: 90.050-170

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3303-8804

E-mail: cep@ufcspa.edu.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE



Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1213540.pdf	08/11/2018 17:31:29		Aceito
Outros	IMG_4191.JPG	08/11/2018 17:30:55	ANA CAROLINA KRUM DOS SANTOS	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	IMG_4190.JPG	08/11/2018 17:30:23	ANA CAROLINA KRUM DOS SANTOS	Aceito
Outros	TCrelatorio.JPG	12/09/2018 14:18:25	ANA CAROLINA KRUM DOS SANTOS	Aceito
Outros	Orientador.JPG	12/09/2018 14:18:10	ANA CAROLINA KRUM DOS SANTOS	Aceito
Outros	RecomendacaoLia.JPG	12/09/2018 14:17:49	ANA CAROLINA KRUM DOS SANTOS	Aceito
Outros	RecomendacaoRenato.JPG	12/09/2018 14:17:36	ANA CAROLINA KRUM DOS SANTOS	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	CartaChefe.JPG	12/09/2018 14:17:09	ANA CAROLINA KRUM DOS SANTOS	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Mestrado12set.docx	12/09/2018 10:45:50	ANA CAROLINA KRUM DOS SANTOS	Aceito
Cronograma	Cronograma.docx	12/09/2018 10:43:59	ANA CAROLINA KRUM DOS SANTOS	Aceito
Orçamento	Orcamento.docx	12/09/2018 10:43:10	ANA CAROLINA KRUM DOS SANTOS	Aceito
Folha de Rosto	Untitled_11092018_143042.pdf	12/09/2018 10:39:23	ANA CAROLINA KRUM DOS SANTOS	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PORTO ALEGRE, 18 de Dezembro de 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE



Assinado por:
Luciane Dalcanale Moussalle
(Coordenador(a))