ISABELA CONDE WATANABE

ESTUDO COMPARATIVO DA ANGIOGÊNESE, EXPRESSÃO DE p53 E ÍNDICE PROLIFERATIVO EM LESÕES CERATOACANTOMA-SÍMILES, COM ÊNFASE NA REGRESSÃO CLÍNICA

CAMPINAS

UNICAMP

2010

i

ISABELA CONDE WATANABE

ESTUDO COMPARATIVO DA ANGIOGÊNESE, EXPRESSÃO DE p53 E ÍNDICE PROLIFERATIVO EM LESÕES CERATOACANTOMA-SÍMILES, COM ÊNFASE NA REGRESSÃO CLÍNICA

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas, área de concentração de Anatomia Patológica

ORIENTADORA: Prof. Dra. Maria Letícia Cintra

CAMPINAS UNICAMP 2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira - CRB-8ª / 6044

W29e	Watanabe, Isabela Conde Estudo comparativo da angiogênese, expressão de p53 e índice proliferativo em lesões ceratoacantoma-símiles, com ênfase na regressão clínica / Isabela Conde Watanabe. Campinas, SP: [s.n.], 2010.
	Orientadores: Maria Letícia Cintra Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.
	 Angiogênese. 2. Ceratoacantoma. 3. Carcinoma de células escamosas. 4. Células-Proliferação. I. Cintra, Maria Letícia. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Título em inglês: Comparative study of angiogenesis, p53 expression and proliferation index in keratoacanthomas and squamous cell carcinomas

Keywords: • Angiogenesis

- Keratoacanthoma
- Squamous Cell carcinoma
- Cell proliferation

Titulação: Mestre em Ciências Médicas Área de Concentração: Anatomia Patológica

Banca examinadora:

Prof^a. Dr^a. Maria Letícia Cintra

Prof^a. Dr^a. Cristiane Furuse

Prof^a. Dr^a. Luciana Rodrigues de Meirelles

Data da defesa: 22-02-2010

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Isabela Conde Watanabe

Orientadora: Profa. Dra. Maria Letícia Cintra

M	lembros:	с. С.		
1.	Profa. Dra. Cristiane Furuse	Wition	Aun	000
2.	Profa. Dra. Luciana Rodrigue	es de Meirelles	Duciana	Henrey
3.	Profa. Dra. Maria Letícia Cint	tra 🔨	al	

Curso de pós-graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 22/02/2010

DEDICATÓRIA

À minha família.

À Profa. Dra. Maria Letícia Cintra, pelo exemplo de dedicação e pela paciência.

À Dra. Renata Magalhães e à Profa. Dra. Aparecida Moraes pelo trabalho realizado, indispensável à realização deste estudo, e pela oportunidade da dar continuidade a esta linha de pesquisa.

Ao Prof. Dr. Konradin Metze, pelo exemplo de entusiasmo pelo conhecimento e pelo auxílio na realização das análises estatísticas deste estudo.

À minha mãe, Rosângela Conde Watanabe, pelo modelo de profissional e pelo apoio em todos os momentos.

Ao meu pai, Luís Massaro Watanabe, pela inspiração.

Ao meu marido, Vítor César da Sforni, pelo companheirismo.

Aos meus irmãos, Sílvia e André Luís, por estarem sempre presente e prontos a ajudar.

Aos meus amigos, pelo enorme apoio.

v

RESUMO

O Ceratoacantoma (CA) é um tumor cutâneo de grande interesse devido às suas características peculiares e relação controversa com o carcinoma espinocelular (CEC). Em razão das similaridades histológicas e da ausência de critérios definitivos, o diagnóstico diferencial entre estas entidades de comportamento biológico distinto é frequentemente problemático. Na tentativa de compreender melhor a patogênese destas neoplasias e com o objetivo de investigar se a avaliação da angiogênese poderia ser útil na distinção entre CA e CEC, nós estudamos, com o auxílio de programa de morfometria digital, a densidade microvascular (DMV) e a expressão da proteína p53 e do antígeno de proliferação celular Ki67 em biópsias incisionais de 40 lesões ceratoacantoma-símiles das quais o curso clínico foi monitorado. Não foram encontradas diferenças estatísticas entre CAs e CECs quanto à expressão de p53 e DMV. O índice proliferativo foi significativamente maior nos CECs, porém com sobreposição entre os grupos dificultando a aplicação deste critério na rotina diagnóstica. Em ambos os tumores, foi demonstrada correlação indireta entre a densidade de vasos neoformados (DMV-CD105) e a densidade de vasos pré-existentes. Para os CAs, foi observada correlação positiva entre DMV-CD105 e índice de Ki67 enquanto os CECs revelaram correlações positivas entre tamanho da lesão e idade e tamanho e p53. A DMV não se mostrou ferramenta útil no diagnóstico diferencial entre CAs e CECs. No entanto, apesar destas neoplasias apresentarem muitas similaridades, as diferentes formas de interação entre as variáveis estudadas indicam que, provavelmente, mecanismos distintos estão envolvidos em sua patogênese.

ABSTRACT

Keratoacanthoma (KA) is a cutaneous tumor of great interest because of its unique characteristics and controversial relationship to squamous cell carcinoma (SCC). We hypothesized that differences in microvessel density (MVD), p53 expression and proliferation index could be related to the distinct behavior between KAs and SCCs and that their assessment could help distinguish between these entities. Immunohistochemical staining was performed with markers for vessels (CD34 and CD105), p53 oncoprotein and cell proliferation (Ki67). Microvessel densities and p53 and Ki67 quantifications were calculated using computer-assisted image analysis. There were no significant differences between KAs and SCCs regarding neither p53 expression nor microvessel density. The Ki67 proliferation index was significantly higher in SCCs, but there was considerable overlap between the groups. We found an indirect correlation between CD105-MVD and the density of pre-existing vessels in both tumors. For KAs we also observed a positive correlation between CD105-MVD and Ki67 index whereas SCCs demonstrated significant positive correlations between tumor size and age and tumor size and p53. MVD was not a useful tool in the distinction between KAs and SCCs. However, despite the fact that these neoplasms have more similarities than differences, there are probably distinct mechanisms involved in their pathogenesis.

CA	Ceratoacantoma
СВС	Carcinoma basocelular
CEC	Carcinoma espinocelular ou Carcinoma de células escamosas
DMV	Densidade microvascular
DMVpré	Densidade microvascular – vasos pré-existentes
DMV-CD34	Densidade microvascular – vasos marcados por CD34
DMV-CD105	Densidade microvascular – vasos marcados por CD105
DP	Desvio padrão
F	Feminino
М	Masculino
mm	Milímetros
рх	Pixel
Unicamp	Universidade Estadual de Campinas
UV	Ultra-violeta
v/mm ²	Vasos por área em milímetros quadrados

Pág.

Tabela 1 Anticorpos..... 38 Tabela 2 Dados descritivos..... 52 Tabela 3 Resultados quantitativos..... 57 Tabela 4 Padrão da expressão dos marcadores imunoistoquímicos em CAs e CECs..... 59 Tabela 5 Padrão e valores de p da expressão dos marcadores imunoistoquímicos nas diferentes fases evolutivas dos CAS..... 59

Pág.

Figura 1-	Fase proliferativa do CA. Fonte: Tan & Lee, Histopathology 2009, 55, 338-345	20
Figura 2-	Fase involutiva do CA. Fonte: Tan & Lee, Histopathology 2009, 55, 338-345	21
Figura 3-	Seleção da ferramenta de calibração métrica no menu do programa Imagelab	39
Figura 4-	Distância em pixels entre os dois pontos na vertical e dois pontos na horizontal cujas distâncias reais são conhecidas	40
Figura 5-	Seleção da ferramenta de elaboração de escala no menu do programa Imagelab	41
Figura 6-	Correspondência da distância entre os pontos em mm ²	42
Figura 7-	Configuração da escala	43
Figura 8-	Contagem vascular utilizando o Imagelab (CD34)	44
Figura 9-	Segmentação manual da área de estroma. Imagelab	45
Figura 10-	Seleção da ferramenta de cálculo de regiões no menu do Imagelab	46
Figura 11-	A área de estroma segmentada é sombreada e calculada. Imagelab	47

Figura 12-	Planilha indicando a escala utilizada e as mensurações realizadas. No canto esquerdo, o valor da área selecionada em mm ²	48
Figura 13-	Exemplo de análise de expressão de Ki67. Os núcleos positivos são marcados com pontos brancos e os negativos, em preto. Na parte inferior da imagem, o programa fornece o total de elementos positivos e negativos contados	49
Figura 14-	Marcação imunoistoquímica para CD34, padrão membrana, em estruturas vasculares no estroma de CA (A) e CEC (B). (Objetiva x40)	54
Figura 15-	Reação imunoistoquímica para CD105 exibindo marcação endotelial em CA (A) e CEC (B). (Objetiva x40)	55
Figura 16-	Reação imunoistoquímica para p53 em CA (A) e CEC (B) mostrando positividade nuclear difusa em ambas lesões. (Objetiva x40)	55
Figura 17-	Positividade nuclear para Ki67 em CA (A) e CEC (B). (Objetiva x40)	56
Figura 18-	Valor médio dos marcadores imunoistoquímicos	58
Figura 19-	Dispersão e coeficiente de correlação entre o CD 105 e o Ki 67 para os ceratoacantomas	60
Figura 20-	Dispersão e coeficiente de correlação entre o CD 105 e o Ki 67 para os CECs	61
Figura 21-	Correlação negativa forte entre CD105 e MVDpré nos CECs	62

Figura 22-	Correlação negativa moderada entre CD105 e MVD pré nos CAs	62
Figura 23-	Dispersão e coeficiente de correlação entre o tamanho do tumor e idade nos carcinomas espinocelulares	63
Figura 24-	Dispersão e coeficiente de correlação entre o tamanho do tumor e P53 nos carcinomas espinocelulares	64
Figura 25-	Dispersão e coeficiente de correlação entre o tamanho do tumor e P53 nos ceratoacantomas	65

Pág.

RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
1- INTRODUÇÃO	17
1.1- Ceratoacantoma	18
1.1.1- Considerações Gerais	18
1.1.2- Apresentação clínica e aspectos histológicos	20
1.1.3- Tipos especiais	22
1.1.4- Regressão	22
1.1.5- Transformação maligna	23
1.1.6- Tratamento	23
1.1.7- Diagnóstico diferencial	24
1.2- Proteína p53	26
1.3- Antígeno de proliferação celular Ki67	28
1.4- Estudo do microambiente - Angiogênese	28
1.5- Justificativa	30
2- OBJETIVOS	32

3- MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1- Pacientes	35
3.2- Imunoistoquímica	37
3.3- Captura de imagens	38
3.4- Calibração métrica	38
3.5- Cálculo da DMV	43
3.6- Expressão de p53 e Ki67	49
3.7- Análise estatística	50
4- RESULTADOS	51
5- DISCUSSÃO	66
6- CONCLUSÃO	71
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73

1- INTRODUÇÃO

1.1- Ceratoacantoma

1.1.1- Considerações gerais

O ceratoacantoma (CA) é uma lesão escamosa proliferativa autolimitada que evolui numa sequência definida de crescimento rápido, maturidade plena e regressão espontânea. Trata-se de tumor cutâneo crateriforme que afeta principalmente adultos na sexta e sétima décadas de vida, com maior incidência no sexo masculino numa razão de 3:1 (Murphy e Elder, 1991).

A fase de crescimento do ceratoacantoma tem duração de 6 a 8 semanas e sua regressão espontânea geralmente se completa após 3 a 6 meses.

O ceratoacantoma afeta preferencialmente áreas fotoexpostas de pessoas de pele clara (fototipo 1 ou 2 de Fitzpatrick), mas lesões em áreas não fotoexpostas podem ocorrer.

O ceratoacantoma foi descrito por Sir Jonathan Hutchinson em 1889, que o caracterizou como "úlcera crateriforme da face", porém sem menção à involução espontânea. Em 1936, uma publicação de MacCormac e Scarff redirecionou a atenção para este tumor. Os autores observaram que o ceratoacantoma cresce rapidamente em 4 a 6 semanas e depois permanece estacionário. Estes autores o denominaram "molusco sebáceo". No entanto, foi considerado muito semelhante molusco 0 nome ao contagioso. Freudenthal cunhou o nome ceratoacantoma em relação a uma das alterações histológicas mais expressivas do tumor, a acantose.

A origem do CA em folículos pilosos parece bem definida. O estudo experimental de Yamagiwa e Ichikawa (1918) demonstrou a evolução histológica destes tumores, iniciando-se da hiperplasia do epitélio da periferia de folículos pilosos. Em 1958, Ghadially confirmou estes achados, demonstrando a origem do CAs da bainha externa dos folículos pilosos. Os CAs originados em mucosas provavelmente representam uma extensão de lesão da pele adjacente ou tumor originando-se de estruturas sebáceas eventualmente presentes nas mucosas (Kopf, 1976; Svirsky et al, 1977).

A etiologia dos ceratoacantomas é incerta e a exposição solar (radiação UV) é o fator mais implicado no surgimento do CA solitário. A carcinogênese induzida pelos raios ultravioleta aparentemente envolve a inativação do gene supressor tumoral p53 e depende da exposição prolongada a este tipo de radiação. Este mecanismo etiológico é comum a outras lesões cutâneas, como o carcinoma epidermóide (CEC). Vários estudos indicaram que a incidência do CA corresponde aproximadamente a um terço da incidência do CEC (Schwartz 1979; Rook e Champion 1963), mas há variações de acordo com a população estudada. Em um estudo sul africano, a incidência relatada foi 1,8 vez superior a do CEC (Whiting, 1978).

Outros fatores etiológicos sugeridos incluem exposição a agentes químicos, trauma, infecção pelo HPV e imunossupressão. Ghadially et al (1963) relataram uma incidência aumentada de CAs em trabalhadores em contato com piche e alcatrão em relação aos controles pareados.

O trauma provavelmente tem um papel na origem do CA. Observou-se um padrão de recorrência dos CAs próximo ou em regiões de enxertos (Rook e Champion, 1963; Schwartz, 1979).

O aparecimento de CAs após transplante de medula óssea ou durante tratamento com ciclosporina sugere a possibilidade de que a imunossupressão seja um fator contribuinte na etiologia deste tumor (Furukawa e Hamada 1992; Guillot e Fesneau 1990). Em pacientes imunossuprimidos, os CAs parecem exibir uma predisposição a crecimento agressivo, recorrência precoce até mesmo transformação para CEC (Walder et al, 1971).

Sequências de DNA do HPV foram detectadas em cerca de 20% dos CA, tanto genitais quanto cutâneos de pacientes imunodeprimidos (Payne et al, 1995; Stockfleth et al, 1999). No entanto, embora a etiologia viral tenha sido sugerida, existem apenas exemplos isolados de sua demonstração em CAs de indivíduos imunocompetentes (Hsi et al, 1997).

1.1.2- Apresentação clínica e aspectos histológicos

Há três estágios na história natural dos CAs: a fase proliferativa, a fase de maturidade e a fase involutiva.

Na fase proliferativa, ocorre o crescimento rápido da lesão, levando à formação de uma pápula hemisférica e firme geralmente atingindo 2 cm ou mais. A borda tem coloração normal ou discretamente eritematosa. Podem ser observadas teleangiectasias. Histologicamente observa-se invaginação da epiderme originando-se de folículos pilosos contíguos e preenchida por lâminas de queratina. Pode haver numerosas figuras de mitose e infiltrado inflamatório dérmico. Nesta fase, o diagnóstico diferencial histológico entre CA e CEC pode ser muito difícil.



Fonte: Tan & Lee, Histopathology 2009, 55, 338-345.

Figura 1- Fase proliferativa do CA.

Na fase de maturidade, a lesão se caracteriza por nódulo côncavo (*dome-shaped* ou *berry shaped*) com área central umbilicada e preenchida por queratina. A lesão geralmente é firme, porém sem induração nas bordas. Se a queratina central é removida, o aspecto resultante é de uma cratera. A epiderme estende-se às margens da cratera. Pode ser observado algum grau de atipia nuclear, mas em geral inferior ao encontrado na fase proliferativa. Nesta fase, a queratinização das células escamosas é intensa resultando em aspecto eosinofílico pálido (*glassy*).

A fase involutiva ocorre após alguns meses e se caracteriza pela reabsorção do tumor e expulsão do *plug c*entral de queratina, resultando em cicatriz discretamente deprimida e geralmente hipopigmentada. A derme adjacente ao epitélio exibe aspecto de tecido de granulação seguido de fibrose.



Fonte: Tan & Lee, Histopathology 2009, 55, 338-345.

Figura 2- Fase involutiva do CA.

1.1.3- Tipos especiais

O CA é geralmente solitário, mas múltiplas lesões podem ocorrer. Existem diversos tipos especiais morfológicos ou sindrômicos, dentre eles: CA dyskeratoticum et segregans, CA centrífugo, CA gigante, CA subungueal, CA itraoral e de membranas mucosas, CA eruptivo generalizado, CA múltiplo, etc. Os subtipos morfológicos especiais não foram incluídos no presente estudo.

1.1.4- Regressão

Estudos recentes sugerem que a regressão tumoral depende principalmente da resposta imune mediada por linfócitos T CD8+ citotóxicos com o auxílio de linfócitos T CD4+. Os linfócitos citotóxicos podem mediar a regressão tumoral através de dois mecanismos distintos: (a) exocitose direta de grânulos contendo granzima B e perforina; e (b) através da ligação do receptor de CD95 nas células-alvo. Batinac et al (2006) demonstraram um aumento significativo de células T expressando granzima B em ceratoacantomas em regressão comparativamente com carcinomas espinocelulares, sugerindo um possível papel da granzima B na regressão do ceratoacantoma.

A apoptose é outro fator que tem sido implicado na regressão do ceratoacantoma, embora o gatilho exato para esse mecanismo permaneça pouco compreendido. Várias proteínas da família do gene bcl-2 estão relacionadas à regulação da morte celular programada e à proliferação celular. Proteínas como bcl-2/bcl-x bloqueiam a apoptose enquanto proteínas bax-símile, como bax e bak, induzem a apoptose. Batinac et al (2006) demonstraram maior expressão de bak e menor expressão de bcl-2 em ceratoacantomas em relação à pele normal. Neste estudo, demonstrou-se expressão de bak significativamente diminuída nos carcinomas espinocelulares. Estes achados sugerem que a apoptose influenciaria o comportamento biológico distinto destas duas neoplasias, tendo papel na regressão do ceratoacantoma. Vale ressaltar que os CAs têm origem do epitélio

de folículos pilosos, cujo ciclo normal envolve uma fase involutiva (catágena) de morte celular programada.

Outro fator contribuinte é a maturação e queratinização progressiva das células, que por fim são eliminadas como um *plug* de queratina.

1.1.5- Transformação maligna

O único critério conclusivo para transformação maligna do CA é a presença de evidências inequívocas de comportamento biológico maligno, seja por infiltração/ agressividade local ou metastatização. Não há, portanto, critérios histopatológicos seguros para este diagnóstico.

Apesar de alguns autores acreditarem que o CA é um tumor precursor do CEC, a progressão do CA para o CEC ou o CEC CA-símile são muito raros. No entanto, deve-se considerar que como frequentemente a modalidade terapêutica eleita para o CA é a mesma do CEC, a verdadeira incidência deste fenômeno é difícil de ser estimada.

Sanchez et al (2000) propuseram que a presença de atipia citológica tem impacto no prognóstico dos CAs e que esta seria um indicador de CAs com potencial de transformação maligna. Strieth et al (2002) estudaram a densidade vascular em CAs com atipia citológica e encontraram maior densidade microvascular nestes tumores em relação a CAs sem atipias, sugerindo que a avaliação da angiogênese poderia servir como ferramenta na tentativa de identificar CAs com potencial de progressão maligna.

1.1.6- Tratamento

Diversas modalidades terapêuticas tem sido utilizadas para o tratamento do CA, geralmente as mesmas utilizadas para CECs e carcinomas basocelulares (CBCs). Apesar da involução espontânea, a intervenção terapêutica

é frequente no sentido de prevenir o envolvimento de estruturas vizinhas ou simplesmente com o intuito de obter melhor resultado estético.

1.1.7- Diagnóstico diferencial: CA versus CEC

Desde que foi descrito, o CA desperta polêmica quanto à sua natureza e relação com o carcinoma epidermóide ou espinocelular (CEC) (Smoller et al, 1986). Clinicamente, o rápido crescimento tumoral do CA pode simular o CEC, tumor biologicamente maligno caracterizado pelo potencial de progressão, destruição tecidual e metastatização.

A característica mais importante que distingue estas duas entidades é a tendência do ceratoacantoma a regredir espontaneamente, porém as causas e mecanismos detalhados desta regressão ainda não são totalmente compreendidos. Alguns autores consideram o CA um tumor benigno, outros um precursor do CEC (Strieth et al, 2002), outros uma variante bem-diferenciada do CEC (Manstein, 1998) ou pelo menos uma forma abortiva de malignidade que somente excepcionalmente progride para CEC (Schwartz, 1979). Devido às marcantes similaridades histológicas e à ausência de critérios definitivos, o diagnóstico diferencial entre CEC e CA é frequentemente problemático.

Relatos na literatura mostrando que lesões inicialmente classificadas como ceratoacantomas evoluíram com metástases demonstram a importância e dificuldade deste diagnóstico diferencial (Hodak et al, 1993). Portanto, é de grande interesse o estabelecimento de marcadores que permitam a distinção entre ceratoacantomas e carcinomas espinocelulares.

Numerosos trabalhos foram publicados descrevendo os critérios úteis no diagnóstico diferencial entre o CA e o CEC (Cribier et al, 1999; Phillips e Helm, 1993; Korenberg et al, 1998; Smoller et al, 1986; Mikhail, 1974; Kern e MacCray, 1980; King e Barr, 1980; Ho et al, 1991; Stephenson et al, 1992). Quanto ao padrão macroscópico, os CAs tendem a ser tanto exofíticos quanto endofíticos com a cratera central preenchida por queratina, enquanto os CECs são predominantemente endofíticos com frequente ulceração. Em termos citológicos, há muitas similaridades entre CAs e CECs e a arquitetura tumoral é uma ferramenta de maior utilidade na sua distinção. Portanto, é fundamental que a biópsia contenha o tecido adiposo subcutâneo para que se possa avaliar tanto a arquitetura da lesão quanto a presença ou ausência infiltração no tecido subjacente. Além dos aspectos arquiteturais, outras características que favorecem o diagnóstico de CA incluem: ausência de anaplasia, limites bem definidos entre o tumor e o estroma, ausência de desmoplasia, presença de fibras elásticas intraepiteliais e abundante glicogênio intracitoplasmático.

No entanto, particularmente na fase proliferativa mais precoce, o ceratoacantoma compartilha diversas características morfológicas com o carcinoma espinocelular, como crescimento infiltrativo e atipia citológica, não existindo critérios morfológicos suficientemente específicos para distinguir estas duas neoplasias.

Alguns métodos imunoistoquímicos têm demonstrado algum sucesso na distinção destas duas entidades. A pesquisa de marcadores para desmogleínas mostrou que estas proteínas desmossômicas estão reduzidas ou ausentes no CEC, mas preservadas uniformemente no CA (Krunic et al, 1996). Os desmossomos provavelmente desempenham papel na supressão da invasão e metastatização (Hiraki et al, 1996).

Estudos imunoistoquímicos demonstraram expressão homogênea de involucrina nas células dos CAs, exceto na camada basal, enquanto sua marcação nos CECs mostrou-se heterogênea de célula para células (Smoller et al, 1986; Suo et al, 1993).

A expressão de sialyl-Tn, carboidrato expresso na superfície de células tumorais, foi encontrada em maior intensidade em CAs do que nos CECs (Jensen et al, 1999).

Quanto aos aspectos moleculares, Clausen et al (2006) demonstraram através de hibridização genômica comparativa um número significativamente maior de aberrações genômicas nos carcinomas espinocelulares em relação aos ceratoacantomas, indicando um maior grau de instabilidade genética nos CECs.

Além disso, os autores encontraram diferentes padrões de aberrações, apontando para mecanismos genéticos distintos envolvidos no desenvolvimento destas duas neoplasias. No entanto, a presença de alterações genéticas comuns às duas neoplasias também foi demonstrada e pode estar associada ao dano do DNA pela irradiação ultravioleta, fator relacionado ao desenvolvimento de ambas as lesões.

1.2- Proteína p53

A ativação de proto-oncogenes e a inativação de genes supressores de tumor são eventos moleculares críticos no processo de carcinogênese. O gene supressor de tumor p53 é um exemplo clássico, encontrado mutado em mais de 50% dos tumores malignos humanos (Hollstein et al, 1991). Mutações do p53 foram descritas no CBC, no CEC e em ceratoses actínicas. Dessa forma, a perda da função do p53 parece ser evento comum na carcinogênese cutânea (Brash et al, 1991).

O gene p53 codifica uma fosfoproteína de 53 KDa, a qual têm sido designada como *guardiã do genoma* (Lane, 1992). Trata-se de uma proteína que funciona como reguladora da resposta celular à injúria genotóxica, incluindo a exposição à radiação ultravioleta (Levine et al, 1001). Esta proteína impede a progressão do ciclo celular além da fase G1, permitindo que o genoma lesado seja reparado antes do término da divisão celular. Quando o dano ao genoma é extenso e o reparo do DNA não é possível, ocorre a indução da apoptose.

A inativação do gene p53 resulta em acúmulo de danos genéticos à célula. A proteína p53 tem papel crítico na manutenção da integridade do genoma.

Em contraste com a proteína p53 do tipo selvagem, cuja meia-vida é muito curta, não sendo facilmente detectável à imunoistoquímica, o gene mutante codifica uma proteína disfuncional mais estável e, portanto, com meia-vida mais longa, levando ao acúmulo intracelular desta proteína e à relativa superexpressão à imunoistoquímica (Lane e Benchimol, 1990).

À análise imunoistoquímica, foi demonstrada a expressão da proteína p53 nas células mais periféricas da maioria dos CAs, assim como dos CECs, apoiando a hipótese de que as mutações deste gene contribuam para o desenvolvimento do CA e que este possa ser um subtipo do CEC (Borkowski et al, 1995; Kerschmann et al, 1994; Perez et al, 1997; Stephenson et al, 1992; Yoke-Sun e Teh, 1994).

Stephenson et al (1992) compararam a expressão da proteína p53 em CAs e CECs e não demonstraram distinção clara entre estes dois tumores. Kerschmann et al (1994) analisaram a expressão de p53 e o índice de proliferação celular em CAs e CECs.

Estes autores encontraram expressão de p53 equivalente nas duas lesões, sugerindo que estas neoplasias deveriam ser consideradas como um espectro de uma mesma entidade. Os autores não encontraram diferença estatisticamente significativa no índice proliferativo de tumores que expressavam ou não p53, tanto para CAs quanto para CECs.

Apesar de Perez et al terem demonstrado correlação entre a expressão forte de p53 e a detecção da mutação do gene, a expressão imunoistoquímica de p53 nos CAs (14 a 94%) contrasta com as poucas mutações encontradas.

Kubo et al não encontraram mutações em 5 casos de CAs. Perez et al encontraram 2 mutações em 16 CAs estudados. Mais recentemente, Suk et al estudaram 49 CAs, dos quais 3 apresentaram mutações de p53.

Esse contraste indica que provavelmente há discrepâncias entre a mutação gênica do p53 e a expressão protéica nos CAs. De fato, defeitos regulatórios no gene p53 podem resultar em superexpressão ou estabilidade do tipo selvagem.

1.3- Antígeno de proliferação celular KI67

Em 1983, foi descrita a preparação de um anticorpo monoclonal de camundongo dirigido a um antígeno presente em células em proliferação, que foi designado como Ki67 (Gerdes et al, 1983). O antígeno Ki67 é uma proteína nuclear definida pela sua reatividade com o anticorpo monoclonal Ki67. Este antígeno está presente durante todas as fases ativas do ciclo celular (fases G1, S, G2 e M), mas ausentes nas células em repouso (fase G0). O antígeno é rapidamente degradado quando a célula deixa o ciclo celular.

A avaliação do índice de proliferação celular através do anticorpo anti-Ki67 (MIB-1) tem sido utilizada em vários estudos com objetivos diagnósticos e prognósticos e tem se mostrado bastante útil.

Kerschmann et al (1994) encontraram uma fração média de proliferação, ao Ki67, maior no CA que no CEC, mas este resultado não teve significância estatística. Bordbar et al (2007) estudaram a expressão do ki67 e seu padrão de distribuição no epitélio, tendo encontrado mais freqüentemente nos carcinomas espinocelulares padrões de positividade difusa ou "caótica" com perda total da polaridade, em comparação com os ceratoacantomas.

1.4- Estudo do microambiente - Angiogênese

Estudos demostraram que o microambiente neoplásico influencia diversos eventos na história natural das neoplasias (Kaur, 2006; Rybka, 2008; Takahara, 2009; Fidler, 1995; Liotta, 2001). Recentemente, Takahara et al (2009) estudaram o microambiente de tumores epiteliais e sugeriram que a expressão estromal de CD10, aumento de macrófagos e redução de células de Langerhans estão associados a proliferação e invasão dos tumores epiteliais malignos. Estes autores encontraram um número significativamente maior de macrófagos dérmicos, supostamente associados a angiogênese, em CECs em comparação com CAs e outros tumores epidérmicos. A angiogênese corresponde à formação de vasos sanguíneos, representando a força propulsora para o crescimento das neoplasias em geral, provendo nutrientes e oxigênio para o metabolismo das células e remoção das excretas. A angiogênese é um fenômeno complexo resultante de uma sequência de eventos que incluem a dissolução da membrana basal, a migração e proliferação de células endoteliais, formação luminal e anastomoses com outros vasos (Shima et al, 1995). Tanto a densidade dos vasos neoformados e seu padrão de distribuição, como a expressão de fatores angiogênicos, são aspectos que têm mostrado correlação com a evolução das neoplasias.

A angiogênese parece ser fator prognóstico independente para a sobrevida global, assim como para a sobrevida livre de doença em diversas neoplasias (Vermeulen et al, 2002). Foi estabelecida correlação entre os padrões de desenvolvimento dos novos vasos e prognóstico nos CECs de cabeça e pescoço (Sharma et al, 2005). Nos melanomas cutâneos, a contagem média de novos vasos mostrou correlação com a regressão histológica (Barnhill e Levy, 1993).

Em 1971, Folkman propôs que a terapia anti-angiogênica poderia ser coadjuvante no tratamento do câncer, impulsionando vários estudos na tentativa de identificar marcadores vasculares. Sabe-se que a expressão dos marcadores de células endoteliais nas neoplasias e nos tecidos normais é heterogênea. Marcadores pan-endoteliais, como o CD31 e o CD34, podem não ser demonstrados nos vasos neoplásicos na mesma intensidade do tecido normal, sendo detectados principalmente nos vasos mais calibrosos (Sharma et al, 2005). Recentemente, observou-se que o CD105 (endoglina), uma glicoproteína de 180 kD associada à proliferação vascular cuja produção é estimulada pela hipóxia, expressa-se preferencialmente nas células endoteliais ativadas envolvidas nos processos de angiogênese, especialmente em tumores. Esta proteína não é detectada ou é apenas minimamente demonstrada nos vasos da maioria dos tecidos normais. O CD105 e o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) são considerados os melhores marcadores de angiogênese (Kumar et al, 1996).

Os receptores de VEGF também se expressam nos vasos neoformados do estroma neoplásico. Os vasos neoformados regridem na ausência do VEGF (Yokoyama et al, 2000). Este evento poderia deflagrar a regressão neoplásica observada nos CAs. Por fim, a análise do estado de diferenciação dos vasos poderia acrescentar informação quanto ao mecanismo de regressão.

A avaliação da angiogênese é realizada principalmente através da microdensidade vascular (DMV), da área total vascular (ATV) ou da estimativa da área vascular através do método de Chakley. A DMV corresponde ao valor médio da contagem do número de vasos em uma determinada área, enquanto a ATV é o valor médio da área total ocupada pelos vasos em uma determinada área. O método de Chalkley é baseado na contagem vascular com o auxílio de uma gratícula em 3 campos previamente selecionados e a média do valor obtido é utilizada para caracterizar o tumor. Em todos estes métodos a seleção da área a ser analisada é frequentemente feita escolhendo-se as áreas de maior vascularização ("hot spots").

Escassos trabalhos na literatura estudaram a angiogênese no ceratoacantoma. Strieth et al (2002) sugeriram que o aumento da densidade microvascular seria um parâmetro diagnóstico indicador de ceratoacantomas com potencial de progressão maligna. Weninger et al (1997), entretanto, não encontraram diferença significativa na densidade microvascular entre ceratoacantomas e carcinomas espinocelulares, sugerindo que a angiogênese não seria um bom marcador para risco metastático e crescimento agressivo em tumores epiteliais da pele.

1.5- Justificativa

O papel da angiogênese como marcador de agressividade biológica e risco metastático em tumores cutâneos permanece controverso, em especial no que se diz respeito ao ceratoacantoma e ao carcinoma espinocelular.

Além disso, os resultados obtidos nos estudos prévios foram baseados na comparação de CAs e CECs cujo diagnóstico foi puramente morfológico. Como 0 diagnóstico diferencial histopatológico entre estas neoplasias é insuficientemente específico e pouco reprodutível, este critério isolado não pode ser considerado padrão-ouro para esta distinção. O presente estudo analisou a expressão de marcador de proliferação celular (Ki67), da proteína p53 e a densidade microvascular em lesões com a configuração arquitetural de ceratoacantomas, porém em que o curso clínico foi monitorado e utilizado como critério diagnóstico na tentativa de eliminar um potencial viés presente nos estudos prévios. Além disso, foram comparados CAs apenas aos CECs ceratoacantomasímiles, crateriformes e de crescimento rápido, que representam o maior desafio no diagnóstico diferencial.

2- OBJETIVOS

Objetivo geral

Comparar a expressão da proteína p53, do antígeno de proliferação celular Ki67 e a angiogênese em ceratoacantomas e carcinomas espinocelulares dos quais o curso clínico foi monitorado na tentativa de compreender melhor seu comportamento biológico distinto e a fim de testar a utilidade destes marcadores no seu diagnóstico diferencial.

Objetivos específicos

- Comparar a expressão do marcador de proliferação celular (Ki67) em ceratoacantomas e carcinomas espinocelulares;
- Comparar a expressão da proteína p53 em ceratoacantomas e carcinomas espinocelulares;
- 3- Comparar a densidade microvascular em ceratoacantomas e carcinomas espinocelulares, com a utilização de marcador pan-endotelial (CD34) e marcador de vasos neoformados (CD105);
- 4- Verificar se diferenças na densidade microvascular poderiam explicar o comportamento biológico distinto de CAS e CECs;
- 5- Testar se a densidade microvascular pode ser utilizada como ferramenta no diagnóstico diferencial entre ceratoacantoma e carcinoma espinocelular;
- 6- Verificar se a correlação entre as variáveis analisadas ajuda na compreensão da patogênese de ceratoacantomas e carcinomas espinocelulares.

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Pacientes

Espécimes fixados em formalina e embebidos em parafina de biópsias incisionais de 43 lesões ceratoacantoma-símiles foram selecionados dos arguivos do Departamento de Anatomia Patológica da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Estes casos correspondem a lesões de 41 pacientes da coorte de um estudo prévio (Magalhães et al, 2008) que analisou as características histopatológicas associadas à regressão clínica de lesões CA-símiles. apresentando lesões cutâneas Neste estudo prospectivo, 0S pacientes compatíveis clinicamente com CA (início súbito e crescimento rápido) e atendidos no ambulatório da Disciplina de Dermatologia de Janeiro de 1995 a Dezembro de consentimento esclarecido, eram submetidos 1999. após ao seguinte procedimento padronizado:

- 1- Após a anamnese e exame dermatológico, as lesões cutâneas ceratoacantomasímiles (lesão pápulo-nodular hemisférica, ceratótica, de crescimento rápido) foram descritas e fotografadas. Em seguida, foi realizada biopsia incisional em fuso das lesões, incluindo toda a espessura do tumor, a fim de permitir a avaliação da arquitetura tumoral e a presença ou ausência de infiltração nos tecidos subjacentes;
- 2- O retorno dos pacientes foi agendado com intervalo de 1 mês para resultado do exame anátomo-patológico e definição da modalidade terapêutica.
- 3- No retorno, os pacientes foram novamente examinados e as lesões mais uma vez medidas, descritas e fotografadas.
- 4- Lesões exibindo sinais de crescimento ou apenas aparente (mínima) regressão foram excisadas com margens, a exemplo da conduta realizada para os casos de CEC;
- 5- Lesões exibindo de regressão foram sinais claros acompanhadas periodicamente, laudo anátomo-patológico CEC, mesmo com de e posteriormente realizada bióspia excisional.
Do total de 54 pacientes inicialmente selecionados, lesões de 13 deles foram excluídas do estudo porque: **1-** o diagnóstico histopatológico era outro que não lesão escamosa CA-símile (verruga viral, ceratose actínica e ceratose folicular invertida); **2-** faltavam dados de acompanhamento clínico posterior; **3-** a índole biológica da neoplasia não pôde ser determinada; **4-** o material de biópsia era pequeno ou inadequado para diagnóstico histológico ou os blocos correspondentes não foram localizados.

Após a aplicação dos critérios de exclusão, 41 pacientes foram selecionados. Os dados clínicos e de acompanhamento foram obtidos das observações arquivadas nos prontuários médicos. Dois dos 41 pacientes apresentaram duas lesões crateriformes, perfazendo, assim, o total de 43 lesões. Dezoito lesões não apresentaram regressão sensível e foram encaminhadas para exérese peri-lesional.

As lâminas histológicas coradas em Hematoxilina-Eosina foram examinadas de forma cega e aleatória por um único dermatopatologista. O conjunto dos achados clínicos e histopatológicos permitiu classificar 32 lesões como CA e 11 como CEC. Doze CAs foram parcialmente excisados (biopsia incisional) num período intermediário entre a fase proliferativa e a maturidade; os demais 20, num período intermediário entre a maturidade e a fase de regressão.

Não foram incluídos no estudo lesões francamente regressivas à apresentação, nem subtipos especiais de CAs.

No presente estudo, 3 das 43 lesões foram excluídas devido à falta de material suficiente para a realização das reações imunoistoquímicas.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa na Universidade Estadual de Campinas.

3.2- Imunoistoquímica

O material incluído em parafina com o fragmento de cada uma das 40 lesões foi recortado pelo mesmo técnico, obedecendo a um procedimento padronizado. Foram realizados cortes de 5 micrômetros de espessura. Os cortes foram desparafinados em xilol e reidratados.

Os anticorpos primários utilizados foram p53 (DO7; Dako) na diluição de 1:100, Ki67 (mib1; Dako) na diluição de 1:150, CD34 (NCL-END; Novocastra) na diluição de 1:100 e CD105 (SN6h; Dako) na diluição de 1:10 (Tabela 1). Exceto para o CD105, a recuperação antigênica foi realizada pelo método do calor úmido utilizando-se tampão Citrato [Synth] ph6,0 para o CD34 e Tris-Edta [Synth] ph 8,9 para o p53 e Ki67 por 30 minutos a 95ºC. Para o anticorpo CD105, a recuperação antigênica foi realizada utilizando-se pepsina a 0,4% na temperatura de 37°C por 30 minutos. Para o CD34, p53 e Ki67, o bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com incubação em peróxido de hidrogênio 10 volumes à temperatura ambiente. Para o CD105, o bloqueio foi realizado com bloqueador de proteína Dako (protein block serum-free Dako). O polímero EnVision Plus (Dako) foi utilizado para amplificar a reação. A revelação foi feita com 3,3-tetraidrocloreto de diaminobenzidina [Sigma, St. Luis, MO, USA] e contracorada com hematoxilina de Mayer. Foram utilizados controles positivos e negativos apropriados. Os casos negativos para Ki67 e p53 sem controle interno foram repetidos.

Anticorpo	Clone	Marca	Diluição	Recuperação antigênica
P53	DO-7	Dako	1:100	Tris-Edta
Ki67	MIB-1	Dako	1:150	Tris-Edta
CD34	NCL-END	Novocastra	1:100	Citrato
CD105	SN6h	Dako	1:10	Pepsina

Tabela 1- Anticorpos

3.3- Captura de imagens

Para cada um dos marcadores imunoistoquímicos, as secções foram avaliadas de forma cega e aleatória (desconhecendo-se os dados clínicos, de evolução ou o diagnóstico histopatológico) por um único patologista (ICW). Em pequeno aumento (x100), foi identificada a área de maior positividade para o marcador, denominada "hot spot"(Weidner et al, 1991). Partindo da área estimada como "hot spot", foram obtidas dez imagens digitalizadas de campos de grande aumento (x400) consecutivos usando microscópio Nikon E200 equipado com câmera Cânon A630. Quando o tamanho da biópsia não permitia a obtenção dez imagens de campos diferentes, todos os campos distintos foram capturados.

3.4- Calibração métrica

Como o programa de morfometria digital Imagelab realiza mensurações em pixel, é necessário realizar a calibração métrica para cálculo de áreas. Com a utilização de lâmina padrão com dois pontos na vertical e dois pontos na horizontal cujas distâncias eram conhecidas, foi elaborada escala com unidade em milímetros. A captura da imagem da lâmina padrão foi realizada utilizando-se o mesmo microscópio, câmera e objetiva usados na obtenção das imagens dos casos (Figuras 3-7).



Figura 3- Seleção da ferramenta de calibração métrica no menu do programa Imagelab



Figura 4- Distância em pixels entre os dois pontos na vertical e dois pontos na horizontal cujas distâncias reais são conhecidas



Figura 5- Seleção da ferramenta de elaboração de escala no menu do programa Imagelab



Figura 6- Correspondência da distância entre os pontos em mm²



Figura 7- Configuração da escala

3.5- Cálculo da DMV

Para os marcadores vasculares, áreas da transição tumor-estroma foram preferencialmente selecionadas enquanto áreas próximas a folículos pilosos foram evitadas. A contagem das estruturas vasculares foi realizada utilizando-se o contador manual do *software* Imagelab. (Figura 8). Qualquer célula ou grupamento de células endoteliais positivas que não estava em continuidade com outras áreas positivas foi considerado uma única estrutura vascular contável. Lúmens vasculares não corados não foram considerados na contagem vascular.



Figura 8- Contagem vascular utilizando o Imagelab (CD34)

Para cada uma das imagens analisadas, o total da área correspondente ao estroma foi calculado utilizando-se o programa de morfometria digital Imagelab, o qual permite segmentação manual de áreas específicas (Figuras 9-12). A seleção manual da região ou regiões correspondentes ao estroma foi realizada em cada uma das imagens capturadas e, através da escala previamente configurada, o valor em mm² foi obtido para posterior cálculo da densidade microvascular.



Figura 9- Segmentação manual da área de estroma. Imagelab



Figura 10- Seleção da ferramenta de cálculo de regiões no menu do Imagelab



Figura 11- A área de estroma segmentada é sombreada e calculada. Imagelab

Editar	Visualizar Ima	aem Filtros	Cor Planilha	Referências Jane	la ?								
Luita				nererencias Jane									
	KHQ 🤊			0.0									
-													
Estru	itura(C:\MESTRA~.	1\CD34TK~3\B00	J222~1\IMG_0963	(JPG)			0	ат		R 8 8	v		
1	A	D:		U U	E	F	6	н		J	ĸ	L	M
1	Data	Dia: 22/10/1	09 Hora: 21:	5: Z								1	
2	Imagan	Estruture/Cills		24TD 2000000	10000 II								
4	mayem	Estrutura(C.)v	Album	341 H 31000222	Yda tagiãos	-G) 62.2%							
5		1024	768		om telseão s	áres total da	imagen						
6		TOLI			Cill Telação a		illiageni						
7	Pixel		1		Densidade	R	#######################################						
8	Unidade:	Largura:	Altura:		óntica média	6	#############						0.0.0.0.0.0
9	mm	0.000224	0.000226		das áreas	B	#############						
10					marcadas	Média	******						
1	Dados Estatis	sticos											
12			MORFOMETRIA	Α	Al	ISORÇÃO DE O	COR	Densidade	NTS HONS HOUSE	DIÂMETROS	CEN	TRO DE M/	ASSA
13		Área	Perímetro	Fator de forma	R	G	B	da estrutura	Diâm.Transv.	Diâm.Maior	Diâm.Menor	X	Y
14	Número:	1	1	0	<u> </u>	<u>hand hand</u>	<u> </u> 1	1		1	1	0	labora la
15	Soma:	0.025	0.696	0.000	79261936.000	78733752.000	90968424.000	**********	0.000	0.223	0.141	0.000	0.000
16	Média:	0.025	0.696	#DIV/0!	79261936.000	78733752.000	90968424.000	*********	#DIV/0!	0.223	0.141	#DIV/0!	#DIV/0
1/	Desvio Padrão:	#DIV/U	#DIV/UI	#DIV/U	#DIV/U	#DIV/U	#DIV/UI	#DIV/UI	#DIV/UI	#DIV/UI	#DIV/UI	#DIV/U	#DIV/U
18	Valor Máximo	0.025	0.696	0.000	79261936.000	78733752.000	90968424.000	********	0.000	0.223	0.141	0.000	0.000
19	Valor Minimo	U.U25	0.635	U.UUU 4001 / 201	400 V01	78733752.000 #D///00	30368424.00L	400.001	U.UUU #DN //01	U.223	U.141	0.000	0.000
20	Significancia 5%	#DIV/01	#DIV/0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0	#DIV/0	#DIV/0!	#DIV/0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0	#DIV/0
22	Significancia 1%	#DIV/U	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/U	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/U	#DIV/0	#DIV/0
23			1										2.2.0.0.0.0
24	Dadosladivid	hais										0000000	
25	Número:	1					1					·	
26	Estrutura	Área	Perímetro	Fator de forma	B	6	B	Densidade	Diâm Transy	Diâm Maior	Diâm Menor	X	Y
27	1	0.025	0.696	1999 (P.L.)	79261936.000	78733752.000	90968424.000	********		0.223	0.141		
28													
29									[
30												[]	
31							<u></u>					1	
32													
33													
34			Į										
35													

Figura 12- Planilha indicando a escala utilizada e as mensurações realizadas. No canto esquerdo, o valor da área selecionada em mm².

As áreas estromais mediram até 0,04mm² em cada imagem digital.

A microdensidade vascular (DMV) foi definida como o número de estruturas vasculares manualmente contadas por unidade de área (v/mm²). A DMV da área mais vascularizada ("hot spot") em cada secção e a DMV correspondente a soma de todas as áreas analisadas por secção foram calculadas. Na tentativa de estimar a densidade dos vasos pré-existentes (DMVpré) foi calculada a diferença entre a DMV obtida utilizando-se o marcador pan-endotelial CD34 (DMV-CD34) e a DMV obtida pela expressão do marcador de vasos neoformados CD105 (DMV-CD105).

3.6- Expressão de p53 e Ki67

Em cada imagem, todos os núcleos positivos e negativos de células epiteliais tumorais foram contados com o auxílio do contador manual do programa Imagelab (Figura 13) A expressão tumoral destes marcadores foi calculada como a porcentagem de células positivas na imagem correspondente ao "hot spot" e no total de células examinadas em cada caso.



Figura 13- Exemplo de análise de expressão de Ki67. Os núcleos positivos são marcados com pontos brancos e os negativos, em preto. Na parte inferior da imagem, o programa fornece o total de elementos positivos e negativos contados

3.7- Análise estatística

Os dados obtidos das biópsias incisionais de 40 lesões CA-símiles foram analisados. A DMV obtida pela expressão de CD34 ou de CD105 e a porcentagem de expressão de Ki67 e p53 foram calculadas utilizando-se o *software* Winstat 3.1. A distribuição normal das variáveis foi testada de acordo com o teste de Kolmogorov - Smirnov. O teste *t* de Student t foi utilizado para avaliar a diferença entre os grupos. As correlações entre as variáveis foram avaliadas por meio da análise de coeficiente de correlação de Pearson. Para determinar quais correlações eram independentes, foram realizadas regressões lineares múltiplas. Além disso, foram calculados os coeficientes de determinação R^2 . Os níveis de significância considerados para rejeição da hipótese nula foram de 5% (p<0,05).

4- RESULTADOS

O presente estudo consiste na análise imunoistoquímica de 29 ceratoacantomas e 11 carcinomas espinocelulares, cujo diagnóstico foi realizado com base na a evolução clínica. Os dados descritivos foram obtidos em estudo prévio (Magalhães et al, 2008) que analisou as características histopatológicas associadas à regressão clínica de lesões CA-símiles e estão resumidos na Tabela 2.

	Sovo	Idade	Tamanho		Diagnóstico
Lesau	Sexu	(anos)	(mm)	LUCAIIZAÇAU	Final
1	М	64	5	região nasal	CA
2	F	64	30	perna	CA
3	F	84	15	perna	CA
4	М	74	20	região nasal	CEC
5	М	64	20	retroauricular	CEC
6	F	83	10	perna	CA
7	F	73	15	região nasal	CA
8	F	77	30	submandibular	CEC
9	F	74	15	perna	CA
10	F	74	8	perna	CA
11	F	62	15	face	CA
12	F	64	10	tórax	CA
13	М	82	10	face	CA
14	F	66	15	tórax	CEC
15	М	86	10	antebraço	CA
16	F	75	25	antebraço	CA
17	М	63	5	face	CA
18	F	64	15	antebraço	CEC
19	F	71		região nasal	CA

	Sovo	Idade	Tamanho	Localização	Diagnóstico
Lesao	Sexo	(anos)	(mm)	Localização	Final
20	М	70	5	tórax	CEC
21	F	76	15	perna	CA
22	F	61	40	tórax	CA
23	Μ	82	17	mão	CA
24	Μ	69	20	antebraço	CA
25	Μ	60	13	antebraço	CA
26	Μ	69	25	braço	CA
27	F	68	20	mão	CA
28	F	92	15	pé	CA
29	F	60	10	braço	CA
30	М	78	20	dorso	CA
31	Μ	60	20	mão	CA
32	Μ	73	20	antebraço	CEC
33	F	70	20	região cervical	CA
34	Μ	27	20	face	CA
35	М	55	20	braço	CA
36	М	84	20	face	CEC
37	F	86	30	antebraço	CA
38	F	90	30	tórax	CEC
39	Μ	93	35	região cervical	CEC
40	F	68	30	tórax	CEC

As reações imunoistoquímicas para os marcadores vasculares CD34 (Figura 14) e CD105 (Figura 15) resultaram em marcação uniforme em intensidade moderada (CD105) a forte (CD34) de membrana citoplasmática de células endoteliais com pouco ou nenhuma reação inespecífica de fundo.



(Objetiva x 40)

Figura 14- Marcação imunoistoquímica para CD34, padrão membrana, em estruturas vasculares no estroma de CA (A) e CEC (B).



(Objetiva x 40)



A detecção imunoistoquímica de p53 (Figura 16) e Ki67 (Figura 17) foi caracterizada por marcação de padrão nuclear com intensidade variável, porém comparável com controles positivos.



(Objetiva x 40).

Figura 16- Reação imunoistoquímica para p53 em CA (A) e CEC (B) mostrando positividade nuclear difusa em ambas lesões



(Objetiva x 40)

Figura 17- Positividade nuclear para Ki67 em CA (A) e CEC (B)

Todas as variáveis examinadas mostraram no teste de Kolmogorov uma boa aproximação da distribuição normal, apoiando o uso de testes paramétricos.

Os dados quantitativos de cada caso estão resumidos na Tabela 3. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre CAs e CECs quanto à densidade microvascular encontrada utilizando-se tanto o anticorpo CD34 (p>0,2) quanto o CD105 (p>0,2). Também não houve diferença estatística na densidade de núcleos positivos para p53 (p>0,2). A positividade para o antígeno de proliferação celular Ki67 foi significativamente maior nos CECs (p =0,0058). (Figura 18 e Tabela 4). Houve, no entanto, sobreposição considerável de valores em ambos os grupos.

Tabela 3- Dados quantitativos

Lesão	Diagnóstico Final	Ki67 (%)	Ki67 (%) hot spot	P53 (%)	P53 (%) hot spot	CD34 (v/mm ²)	CD34 hot spot	CD105 (v/mm²)	CD105 hot spot
1	CA	20.867	26.437	9.917	16.788	353.91	1000	278.26	666.67
2	CA	7.259	13.924	0	0	424.42	640	293.89	631.58
3	CA	20.638	30.435	1.318	6.818	360.25	760	230.09	409.09
4	CEC	31.542	54.737	63.041	72.464	354.84	1400	500	875
5	CEC	20.637	31.148	79.552	89.474	557.38	869.57	103.9	400
6	CA	20.21	33.333	55	68.868	459.12	800	329.63	533.33
7	CA	32.923	47.794	48.439	74.419	288.14	461.54	199.22	368.42
8	CEC	33.257	40.58	64.954	75.362	370.13	606.06	402.99	1000
9	CA	13.383	31.429	46.459	67.949	382.59	625	305.14	550
10	CA	24.617	40	13.904	26.214	385	612.9	424.53	760
11	CA	6.519	11.765	58.999	71.111	173.18	333.33	239.13	666.67
12	CA	9.895	23.077	63.56	74.444	235.47	357.14	199.12	500
13	CA	35.488	48.214	69.793	77.228	542.22	1333.33	602.41	941.18
14	CEC	24.693	35.897	34.783	56.044	324.76	722.22	279.85	727.27
15	CA	18.795	26.866	53.394	70.69	535.17	826.09	437.5	809.52
16	CA	13.763	24.138	2.521	14	341.39	777.78	174.72	636.36
17	CA	8.72	29.167	13.936	27.517	417.45	666.67		0
18	CEC	13.355	27.273	0	0	457.63	636.36	242.8	473.68
19	CA	19.975	27.972	59.324	73.913	344.44	928.57	349.75	1000
20	CEC	13.3	34.409	0	0	304.88	923.08	413.46	857.14
21	CA	14.667	34.783	50.815	75	398.77	1333.33	449.06	944.44
22	CA	25.745	35.333	47.364	58.559	418.01	793.1	248	800
23	CA	20.229	41.509	25.824	33.333	260.87	350	328.28	562.5
24	CA	21.582	34.444	79.555	89.535	614.86	1346.15	265.57	545.45
25	CA	12.511	23.14	11.978	27.273	668.51	1285.71	330.71	500
26	CA	34.358	55.405	22.37	57.576	296.3	529.41	362.75	750
27	CA	17.192	58.537			398.31	1833.33	333.33	857.14
28	CA	19.47	50	32.353	55.385	378.84	600	376.62	642.86
29	CA	21.146	40	32.217	47.059	498.36	1045.45	429.69	1200

Lesão	Diagnóstico Final	Ki67 (%)	Ki67 (%) hot spot	P53 (%)	P53 (%) hot spot	CD34 (v/mm ²)	CD34 hot spot	CD105 (v/mm²)	CD105 hot spot
30	CA	21.898	44.444	48.837	64.286	255.26	384.62	252.34	333.33
31	CA	15.6	30.556	71.788	82.353	696.55	850	336.42	551.72
32	CEC	37.54	57.252	79.943	91.379	379.71	684.21	274.07	407.41
33	CA	32.899	46.575	47.915	61.151	442.23	633.33	337.5	1000
34	CA	14.508	23.636	30.094	48.198	322.03	500	216.29	523.81
35	CA	10.193	18.072	53.037	63.758	266.85	484.85	234.64	1000
36	CEC	44.786	67.606	31.304	46.154	436.97	888.89	201.26	391.3
37	CA	19.694	31.25	33.811	44.928	312.5	394.74	148.24	307.69
38	CEC	20.924	33.913	67.718	80.407	484.08	1038.46	21.08	52.63
39	CEC	24.527	42.735	46.36	59.333	412.59	666.67	590.28	1153.85
40	CEC	48.426	56.383	55.394	72.632	433.9	823.53	137.25	285.71



Figura 18- Valor médio dos marcadores imunoistoquímicos

	Ki67	p53	CD34	CD105
CA				
Média	19,13	38,73	395,55	300,44
Desvio Padrão	7,83	22,79	126,08	113,28
CEC				
Média	28,45	47,55	410,62	287,90
Desvio Padrão	11,77	28,35	73,92	174,06

Tabela4-Médiaedesvio-padrãodaexpressãodosmarcadoresimunoistoquímicos em CAs e CECs

Não foram encontradas diferenças na expressão de Ki67, p53 ou na densidade microvascular nas diferentes fases evolutivas dos CAs (Tabela 5).

Tabela 5- Média, desvio-padrão e valores de *p* da expressão dos marcadoresimunoistoquímicos nas diferentes fases evolutivas dos CAs

	Ki67	р53	CD34	CD105
CA (fase 1*)				
Média	21,74	37,79	361,36	317,88
Desvio Padrão	9,76	21,14	108,03	117,10
CA (fase 2**)				
Média	17,28	39,34	419,69	288,13
Desvio Padrão	5,75	24,42	135,27	112,42
р	0,13	0,86	0,23	0,50

*fase 1: intermediária entre estágio proliferativo e maturidade;

**fase 2: intermediária entre maturidade e regressão.

Quanto aos resultados analíticos, foi encontrada correlação positiva moderada entre densidade vascular pelo CD105 e índice proliferativo (Ki67) nos CAs (r=0,43; p=0,019; Figura 19), o que não foi observado nos CECs, o qual não demonstrou correlações entre densidade de vasos CD105 positivos e idade, tamanho da lesão, expressão de ou expressão de Ki67 (Figura 20) para (p>0,2 para todas).



Figura 19- Dispersão e coeficiente de correlação entre o CD 105 e o Ki 67 para os ceratoacantomas



Figura 20- Dispersão e coeficiente de correlação entre o CD 105 e o Ki 67 para os CECs.

Nos CECs observou-se correlação indireta forte entre CD105 e a densidade de vasos pré-existentes (r=-0,969; p<0,001; Figura 21). Nos CAs também foi observada correlação negativa moderada entre Cd105 e a densidade de vasos pré-existentes (r=-0,486; p=0,008; Figura 22), a qual foi significativamente mais fraca do que a encontrada para os CECs.



Figura 21- Correlação negativa forte entre CD105 e MVDpré nos CECs





Na regressão linear múltipla para a DMV-CD105 nos CAs, o índice de Ki67 e o log da DMVpré permaneceram como variáveis independentes (p=0,004; R^2 =0,31), enquanto que na correlação linear múltipla para a DMV-CD105 nos CECs, apenas a DMV pré mostrou-se variável independente (p<0,001; R^2 =0,83).

Para os CECs houve correlações positivas entre tamanho da lesão e idade (r=0,617; p=0,043; Figura 23) e tamanho da lesão e expressão de p53 (r=0,59 p=0,05; Figura 24), as quais se mostraram independentes na regressão linear múltipla. Para os CAs, não foram encontradas correlações significantes entre tamanho do tumor e idade, Ki67 ou p53 (p>0,2 para todas; Figura 25).



Figura 23- Dispersão e coeficiente de correlação entre o tamanho do tumor e idade nos carcinomas espinocelulares



Figura 24- Dispersão e coeficiente de correlação entre o tamanho do tumor e P53 nos carcinomas espinocelulares



Figura 25- Dispersão e coeficiente de correlação entre o tamanho do tumor e P53 nos ceratoacantomas

5- DISCUSSÃO

O ceratoacantoma é uma lesão cutânea escamosa que desperta grande interesse no estudo da carcinogênese devido às suas características únicas e relação controversa com o carcinoma espinocelular. Enquanto o CEC caracteriza-se pelo comportamento biologicamente maligno com potencial de progressão, destruição tecidual e metastatização, o CA é definido pela sua involução espontânea. A razão para o comportamento biológico diametralmente oposto entre estas neoplasias ainda não é compreendida.

Diante da dificuldade de se distinguir estas duas entidades do ponto de vista histopatológico, muitas hipóteses foram formuladas, particularmente quanto ao CA ser, de fato, uma entidade biológica distinta do CEC ou se seu comportamento singular é mais uma função de fatores determinados primariamente pelo hospedeiro no qual ele ocorre.

A angiogênese parece desempenhar papel importante na progressão tumoral, pois o crescimento neoplásico depende do suprimento adequado de nutrientes e oxigênio (Folkman, 1990). O recrutamento de pequenos novos vasos, do hospedeiro para o tumor, é decorrente, ao menos em parte, das mesmas alterações genéticas (oncogenes ativados, inativação ou perda dos genes de supressão tumoral) envolvidas em outras frentes da transformação maligna, como mitogênese aberrante e resistência à apoptose. Potentes oncogenes podem modificar a expressão tanto dos fatores de crescimento como dos inibidores da angiogênese nas células neoplásicas. A forma e a magnitude de ação pró-angiogênica podem ser modificadas pelo tipo celular (origem epitelial ou mesenguimatosa), fatores epigenéticos (hipóxia, densidade celular) e/ou a presenca de danos genéticos adicionais (disfunção prévia dos genes p53 supressores de tumor) (Rak et al, 2000). Além disso, o aumento da densidade vascular eleva a probabilidade das células tumorais atingirem a circulação (Liotta, 1974; Liotta 1991). Ao contrário do CEC, o CA geralmente não metastatiza.

A hipótese de que diferenças na angiogênese poderiam explicar, pelo menos em parte, o comportamento biológico distinto de CAs e CECs motivou estudos prévios, assim como o presente estudo. Weninger e cols (1997) investigaram a microdensidade vascular em carcinomas basocelulares (CBCs), CECs e CAs e encontraram densidade vascular significativamente mais baixa nos CBCs em comparação com CAs e CECs, porém não houve diferença estatisticamente significante na DMV entre estas duas últimas neoplasias. Neste estudo, decidimos reavaliar a densidade microvascular, comparando os resultados de CAs e CECs cujo diagnóstico foi baseado na evolução clínica, na tentativa de eliminar um potencial viés decorrente do diagnóstico diferencial puramente morfológico.

Nossos resultados estão de acordo com os achados de Weninger e cols (1997), pois a avaliação da DMV utilizando tanto um marcando pan-endotelial (CD34) quanto uma marcador de neovascularização (CD105) não revelou diferenças significativas entre os tumores. Portanto, nós compartilhamos com estes autores a opinião de que a microdensidade vascular tumoral provavelmente não é um bom indicador para progressão ou potencial metastático nestas neoplasias.

Por outro lado, Strieth e cols (2002) encontraram correlação forte entre presença de atipia citológica e aumento da densidade vascular em CAs e propuseram que a densidade vascular poderia ser um fator indicador da probabilidade de transformação maligna do CA para o CEC. No nosso estudo, a atipia citológica não foi avaliada devido à reprodutibilidade baixa desse critério (Farmer, 1996), especialmente como ferramenta para discriminar CA e CEC ou, ainda, para subdividir os CAs em tumores com maior ou menor risco de comportamento desfavorável.

Os dados quantitativos do nosso estudo não demonstraram poder de discriminação entre CAs e CECs, exceto pelo índice de proliferação celular (Ki67), o qual foi maior nos CECs. No entanto, a grande sobreposição entre os dois grupos torna difícil a aplicação deste critério na rotina do patologista geral, pois exigiria a utilização de métodos quantitativos pouco práticos e que requerem grande consumo de tempo.

Apesar dos marcadores imunoistoquímicos avaliados no presente estudo não terem se mostrado úteis na distinção das duas entidades, foram encontradas algumas diferenças que podem apontar para mecanismos distintos da patogênese tumoral. Enquanto a neoformação vascular (CD105) nos CAs está correlacionada com o índice proliferativo do tumor, nos CECs tal associação não foi demonstrada. Este achado pode indicar a existência de formas diferentes de interação tumor-microambiente entre as duas neoplasias. As correlações entre idade e tamanho da lesão e p53 e tamanho da lesão encontradas somente nos CECs também podem apontar para mecanismos de progressão tumoral diferentes para cada tumor. No entanto, o real significado destes achados depende de novos estudos, com maior número de casos.

Destaca-se, o achado em ambas as neoplasias de que a neoformação vascular (CD105-DMV) é menor quanto maior o número de vasos pré-existentes estimados (DMVpré). Talvez, isto poderia indicar que cada tumor atinge um limite intrínseco de densidade vascular ideal para seu suprimento utilizando tanto os vasos já existentes no tecido quanto estimulando a neoformação vascular. Particularmente para os CECs, esta hipótese pode ser verdadeira, pois a correlação indireta é bastante forte, confirmada pelo alto coeficiente de determinação. Para os CAs, o coeficiente de determinação é mais fraco. No entanto, estes achados são apenas resultados isolados que necessitam de confirmação posterior.

Vale ressaltar também que a variância do índice proliferativo (Ki67) juntamente com a variância da DMVpré explica somente 30,7% da variância da DMV-CD105. Esta observação indica que há outros fatores importantes além da capacidade proliferativa tumoral e da quantidade de vasos pré-existentes que influenciam a angiogênese e que ainda permanecem pouco compreendidos.

Este trabalho, até onde sabemos, é o primeiro estudo sistemático da angiogênese de lesões CA-símiles no qual com o objetivo de melhorar os critérios histopatológicos do diagnóstico diferencial, a evolução clínica foi utilizada na determinação do diagnóstico final. Além disso, foram comparados apenas CECs

de crescimento rápido e com a configuração arquitetural do CA. Outros pontos fortes deste estudo foram a inclusão de lesões relativamente uniformes em tamanho e de pacientes relativamente uniformes em idade, em cada grupo. Por outro lado, o pequeno número de CECs CA-símiles pode ter reduzido o poder estatístico para esta entidade, sendo um fator limitante deste estudo.

Em resumo, a partir dos nossos dados, podemos concluir que a densidade microvascular não é uma ferramenta útil na distinção entre CAs e CECs. Além disso, não foram encontradas diferenças na MVD que expliquem o comportamento biológico oposto destas neoplasias. No entanto, apesar destas duas entidades apresentarem muitas similaridades clínicas e histológicas, é evidente que importantes diferenças existem na patogênese destas lesões, determinando características evolutivas completamente antagônicas. Mais estudos são necessários na tentativa de entender melhor o ceratoacantoma e sua relação com o carcinoma epidermóide, o que certamente implicará em uma maior compreensão dos mecanismos de carcinogênese em geral.

6- CONCLUSÃO
- A densidade microvascular avaliada tanto através de marcador pan-endotelial (CD34) quanto através de marcador de vasos neoformados e a expressão de p53 não se mostraram ferramentas úteis no diagnóstico diferencial entre CAs e CECs;
- 2- Não foram encontradas diferenças na MVD que auxiliem na compreensão do comportamento biológico oposto de CAs e CECs;
- 3- O índice de proliferação celular calculado pela expressão de Ki67 foi significativamente maior nos CECs, porém com sobreposição entre os grupos, limitando sua utilização na rotina diagnóstica;
- 4- A correlação negativa entre angiogênese e densidade de vasos pré-existentes em ambas as neoplasias pode indicar que para cada um desses tumores exista um limite intrínseco de densidade vascular;
- 5- As diferentes formas de interação entre as variáveis estudadas podem apontar para mecanismos distintos envolvidos na patogênese de CAs e CECs, porém que necessitam de novos estudos com maior número de casos.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Barnhill RL, Levy MA. Regressing thin cutaneous malignant melanoma (<1mm) are associated with angiogenesis. Am J Pathol. 1993. 143:99-104.

Batinac T, Zamolo G, Coklo M, Hadzisejdic I. Possible key role of granzyme B in keratoacanthoma regression. Med Hypotheses 2006. 66:1129-1132.

Bayer-Garner IB, Ivan D, Schwartz MR, Tschen JA. The immunopathology of regression in benign lichenoid keratosis, keratoacanthoma and halo nevus. Clin Med Res. 2004. 2:89-97.

Bordbar A, Dias D, Cabral A, Beck S, Boon ME. Assessment of cell proliferation in benign, premalignant and malignant skin lesions. Appl Immunohistochem Mol Morphol 2007. 15(2):229-235.

Borkowski A, Bennett WP, Jones RT, Borkowski P, Harris CC, Ferreira LR, Kao GF, Trump BF. Quantitative image analysis of p53 protein accumulation in keratoacanthomas. Am J Dermatopathol. 1995. 17:335-8.

Brash DE, Rudolph JA, Simon JA et al. A role for sunlight in skin cancer: UV-induced p53 mutations en squamous cell carcinomas. Proc. Natl. Acad. Sci. 1991; 88:10124-10128.

Burrows FJ, Derbyshire EJ, Tazzari PL et al. Up-regulation of endoglin on vascular endothelial cells in human solid tumors: implications for diagnosis and therapy. Clin Cancer Res 1995; 1:1623.

Clausen OPF, Aass HC, Beigi M et al. Are keratoacanthomas variants of squamous cell carcinomas? A comparison of Chromossomal aberrations by comparative genomic hybridization. Joun Invest Dermatol 2006. 126:2308-2315.

Cribier B, Asch P-H, Grosshans E. Differentiating Squamous Cell Carcinoma from Keratoacanthoma using histopathological criteria - Is it posible? A study of 296 cases. Dermatology 1999; 199:208-212.

Duff SE, Li C, Garland JM, Kumar S. CD105 is important for angiogenesis: evidence and potential applications. FASEB J 2003; 17:984.

Farmer ER, Gonin R, Hanna MP. Discordance in the histopathologic diagnosis of melanoma and melanocytic nevi between expert pathologists. Hum Pathol 1996; 27:528.

Fidler IJ. Modulation of the organ microenvironment for treatment of cancer metastasis. J Natl Cancer Inst 1995; 87:1588.

Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other diseases. Nat Med 1995. 1:27-31.

Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? J Natl Cancer Inst 1990; 82:4.

Fonsatti E, Sigalotti L, Arslan P, Altomonte M, Maio M. Emerging role of endoglin (CD105) as a marker of angiogenesis with clinical potential in numan malignancies. Curr Cancer Drug Targets 2003; 3:427.

Furukawa M, Hamada T, Shibata H, Masaoka T. Keratoacanthoma ensuing from bone marrow transplantation for chronic myeloid leukemia. Osaka City Med J. 1992, 38:83-8.

Gerdes J. Er al. Production os a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. Int J Cancer 1983, 31:13-20.

Ghadially FN, Barton BW, Kerridge BW. The etiology of keratoacanthoma. Cancer 1963, 16:603-611.

Ghadially FN. The role of the hair follicle in the origin and evolution of some cutaneous neoplasms in experimental animals. Cancer 1961, 14:801-816.

Griffiths RW. Keratoacanthoma observed. Br J Plast Surg 2004. 57:485-501.

Guillot B, Fesneau H, Mourad G, Mion C, Guilhou JJ. Multiple keratoacanthoma during cyclosporin therapy. Presse Med. 1990 7-14; 19:1286.

Hiraki A, Shinohara M, Ikebe T, Nakamura S, Kurahara S, Garrod DR. Immunohistochemical staining of desmosomal components in oral squamous cell carcinomas and its association with tumor behavior. Br J Cancer 1996; 73:1491-1497.

Ho T, Horn T, Finzi E. Transforming growth factor α expression helps to distinguish keratoacanthomas from squamous cell carcinomas. Arch Dermatol 1991; 127:1167-1171.

Hodak E, Jones RE, Ackerman AB. Solitary keratoacanthoma is a squamous-cell carcinoma: three examples with metastases. Am J Dermatopathol. 1993. 15:332-42.

Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. P53 mutations in human cancer. Science 1991. 253:49-53.

Hsi ED, Svoboda-Newman SM, Stern RA et al.. Detection of human papillomavirus DNA in keratoacanthomas by polimerase chain reaction. Am J Dermatopathol. 1997. 19:10-15.

Hutchinson JA. Morbid growths and tumours: the crateriform ulcer of the face, a form of epithelial cancer. Trans Pathol Soc Lond 1889; 40:275.

Jensen P, Clausen OPF, Bryne M. Differences in sialyl-Tn antigen expression between keratoacanthomas and cutaneous squamous cell carcinomas. J Cutan Pathol 1999; 26: 183-189.

Kao GF, Farmer ER. Benign tumors & carcinoma "in situ" of the epidermis. In: Farmer ER, Hood AF (editors). Pathology of the skin. McGrawn-Hill New York -USA. 2000 p.942-946. Kaur P, Mulvaney M, Carlson JA. Basal cell carcinoma progression correlates with host immune response and stromal alterations: a histologic analysis. Am J Dermatopathol 2006; 28:293.

Kern WH, McCray MK. The histopathologic differentiation of Keratoacanthoma and squamous cell carcinoma of the skin. J Cutan Pathol 1980; 7:318-325.

Kerschmann RL, McCalmont TH, LeBoit PE. p53 oncoprotein expression and proliferation index in Keratoacanthoma and Squamous Cell Carcinoma. Arch Dermatol 1994; 130:181-186.

King DF, Barr RJ. Intraepithelial elastic fibers and intracytoplasmatic glycogen: diagnostic aids in differentiating keratoacanthoma from squamous cell carcinoma. J Cutan Pathol 1980; 7:140-148.

Kopf, AW. Keratoacanthoma. In: Carcinoma of the skin, 1976, p.755. Saunders, Philadelphia.

Korenberg R, Penneys NS, Kowalczyk A, Nadji M. Quantitation of S100 proteinpositive cells in inflamed and non-inflamed keratoacanthoma and squamous cell carcinoma. J Cutan Pathol 1988; 15:104-108.

Krunic AL, Garrod DR, Smith NP, Orchard GS, Cvijetic OB. Differential expression of desmosomal glycoproteins in keratoacanthoma and squamous cell carcinoma of the skin. An immunohistochemical aid to diagnosis. Acta Derm Venereol 1996; 76:394-398.

Kubo Y, Urano Y, Yoshimoto K et al. p53 gene mutations in human skin cancers and precancerous lesions: comparison with immunohistochemical analysis. J Invest Dermatol 1994; 102:440-444.

Kumar P, Wang JM, Bernabeu C. CD 105 and angiogenesis. J Pathol 1996; 178:363-366.

Lane DP, Benchimol S. P53: oncogene or anti-oncogene. Gen Dev. 1990; 4:1-8.

Lane DP. P53, guardian of the genome. Nature. 1992; 358:15-16.

Lawrence N, Reed RJ. Actinic keratoacanthoma: speculations on the nature of the lesion and the role of cellular immunity in its evolution. Am J Dermatopathol 1990; 12:517-533.

Levine AJ, Momand J, Finlay CA. The p53 tumor supressor gene. Nature. 1991; 351:453-456.

Liotta LA, Kleinerman J, Saidel GM. Quantitative relationships of intravascular tumor cells, tumor vessels, and pulmonary metastases following tumor implantation. Cancer Res 1974; 34:997.

Liotta LA, Kohn EC. The microenvironment of the tumor-host interface. Nature 2001; 411:375.

Liotta LA, Steeg PS, Stetler-Stevenson WG. Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. Cell 1991; 64:327.

MacCormac, H, Scarff, RW. Molluscum sebaceum. Br J Dermatol 1936; 48:624.

Magalhães RF, Cruvinel GT, Cintra ML, Ismael AP, de Moraes AM. Diagnosis and follow-up of keratoacanthoma-like lesions: clinical and histologic study of 43 cases. J Cutan Med Surg 2008; 12:163.

Manstein CH, Frauenhoffer CJ, Besden JE. Keratoacanthoma: is it a real entity? Ann Plast Surg 1998; 40:469.

Mikhail GR. Squamous cell carcinoma diagnosed as keratoacanthoma. Cutis 1974; 13:378-382.

Murphy GF, Elder DE. Atlas of Tumor Pathology - Non-melanocytic Tumors of the Skin. Third Series, Fascicle 1. Armed Forces Institute of Pathology. 1991; p21-27.

Offersen BV, Borre M, Overgaard J. Quantification of angiogenesis as a prognostic marker in human carcinomas: a critical evaluation of histopathological methods for estimation of vascular density. Eur J Cancer 2003; 39:881.

Papadavid E, Pignatelli M, Zakynthinos S, Krausz T, Chu AC. The potential role of abnormal E-cadherin and α -, β - and γ -catenin immunoreactivity in the determination of the biological behaviour of Keratoacanthoma. Br J Dermatol 2001; 145:582-589.

Patel A, Halliday GM, Cooke BE, Barnetson RStC. Evidence that regression in Keratoacanthoma is immunologically mediated: a comparision with Squamous Cell Carcinoma. Br J Dermatol 1994; 131:798-798.

Payne D, Newman C, Tyring S. Human papillomavirus DNA in nonanogenital keratoacanthoma and squamous cell carcinoma of patients with HIV infection. J Am Acad Dermatol. 1995; 33:1047-1049.

Perez MI, Robins P, Biria S, Roco J, Siegel E, Pellicer A. P53 oncoprotein expression and gene mutations in some Keratoacanthomas. Arch Dermatol 1997; 133:189-193.

Phillips P, Helm KF. Proliferating cell nuclear antigen distribution in Keratoacanthoma and Squamous Cell Carcinoma. J Cutan Pathol 1993; 20:424-428.

Rak J, Yu JL, Klement G, Kerbel RS. Oncogenes and angiogenesis: signaling three-dimensional tumor growth. J Inv Dermatol. 2000; 5:24-33.

Rook A, Champion RH. Keratoacanthoma. Natl Cancer Inst Monogr 1963; 10:197-214.

Rybka MO, Cintra ML, de Souza EM, Metze K. Density of dendritic cells around basal cell carcinomas is related to tumor size, anatomical site and stromal charactertistics, and might be responsible for the resoponse to topical therapy. Int J Dermathol 2008; 47:1240.

Schwartz RA. Keratoacanthoma. J Am Acad Dermatol 1994; 30:1-19.

Schwartz, RA. The Keratoacanthoma: A Review. J Surg Oncol 1979; 12:305.

Sharma S, Sharma MC, Sarkar C. Morphology of angiogenesis in human cancer: a conceptual overview, histoprognostic perspective and significance of neoangiogenesis. Histopathology 2005; 46:481-489.

Shima DT, Saunders KB, Gougos A et al. Alterations in gene espression associated with changes in the state of endothelial differentiation. Differentiation 1995; 58:217-226.

Smoller BR, Kwan TH, Said JW, Banks-Schlegel S. Keratoacanthoma and squamous cell carcinoma of the skin: immunohistochemical localization of involucrin and keratin proteins. J Am Acad Dermatol 1986; 14:226-234.

Soares AB, Juliano PB, Araujo VC, Metze K, Altemani A. Angiogenic switch during tumor progression of carcinoma ex-pleomorphic adenoma. Virchows Arch 2007; 451: 65.

Srivastava A, Laidler P, Davies RP, Horgan K, Hughes LE. The prognostic significance of tumor vascularity in intermediate-thickness (0.76-4.0 mm thick) skin melanoma. A quantitative histologic study. Am J Pathol 1988; 133:419.

Stephenson TJ, Royds J, Silcocks PB, Bleehen SS. Mutant p53 oncogene expression in Keratoacanthoma and squamous cell carcinoma. Br J Dermatol 1992; 127:566-570.

Stockfleth E, Meinke B, Arndt R et al. Identification of DNA sequences of both genital and cutaneous HPV types in a small number of keratoacanthomas of imunosupressed patients. Dermatology. 1999; 198:122-125.

Strieth S, Hartschuh W, Pilz L et al. Carcinoma-like vascular density in atypic keratoacanthoma suggests malignant progression. Br J Cancer 2002; 87:1301-1307.

Suk JD, Park WS, Kim DK. Low rates of somatic p53 mutations in keratoacanthomas. J Dermatol Sci. 2009; 53(1):72-73.

Suo Z, Holm R, Nesland JM. Squamous Cell Carcinoma. An immunohistochemical study of cytokeratins and involucrin in primary and metastatic tumours. Histopathology 1993; 23:45-54.

Svirsky JA, Freedman PD, Lumerman H. Solitary intraoral keratoacanthoma. Oral Surg 1977, 43:116-122.

Takahara M, Chen S, Kido M et al. Stromal CD10 expression, as well as increased dermal macrophages and decreased Langerhans cells, are associated with malignant transformation of keratinocytes. J Cutan Pathol 2009; 36:668.

Tanaka F, Otake Y, Yanagihara K et al. Evaluation of angiogenesis in non-small cell lung cancer: comparison between anti-CD34 antibody and anti-CD105 antibody. Clin Cancer Res 2001; 7:3410.

Vermeulen PB, Gasparini G, Fox SB et al. Second international consensus on the methodology and criteria of evaluation of angiogenesis quantification in solid human tumors. Eur J Cancer 2002; 38:1564-1579.

Walder BK, Robertson MR, Jeremy D. Skin cancer and immunosupression. Lancet 1971; 2:1282-1283.

Wang JM, Kumar S, Pye D, Haboubi N, Al-Nakib L. Breast carcinoma: comparative study of tumor vasculature using two endothelial markers. J Natl Cancer Inst 1994; 86: 386.

Wang JM, Kumar S, Pye D, van Agthoven AJ, Krupinski J, Hunter RD. A monoclonal antibody detects heterogeneity in vascular endothelium of tumours and normal tissues. Int J Cancer 1993; 54:363.

Weedon D, Strutton G. In: Weedon D (editor). Skin Pathology 2nd ed. Ed Churchill Livingstone. Sydney, Australia. 2002; p778-782.

Weidner N, Carroll PR, Flax J, Blumenfeld W, Folkman J. Tumor angiogenesis correlates with metastasis in invasive prostate cancer. Am J Pathol 1993; 143:401.

Weidner N, Folkman J, Pozza F et al. Tumor angiogenesis: a new significant and independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma. J Natl Cancer Inst 1992; 84:1875.

Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma. N Engl J Med 1991; 324:1.

Weninger W, Rendl M, Pammer J, Grin W, Petzelbauer P, Tschachler E. Differences in tumor microvessel density between squamous cell carcinomas and basal cell carcinomas may relate to their different biologic behavior. J Cutan Pathol 1997; 24:364-369.

Wesseling P, Schlingemann RO, Rietveld FJ, Link M, Burger PC, Ruiter DJ. Early and extensive contribution of pericytes/vascular smooth muscle cells to microvascular proliferation in glioblastoma multiforme: an immuno-light and immuno-electron microscopic study. J Neuropathol Exp Neurol 1995; 54:304-310.

Whiting DA. Skin tumors in white South Africans. S Afr Med J 1978; 53:98-102, 131-136, 162-170.

Yamagiwa K, Ichigawa K. Experimental study of the pathogenesis of carcinoma. J Cancer Res 1918; 3:1-29.

Yoke-Sun L, Teh M. P53 expression in pseudoepitheliomatous hyperplasia, keratoacanthoma, and squamous cell carcinoma of skin. Cancer 1994; 73(9):2317-2323.

Yokoyama, Y, Sato, S, Futagami, M, Fukushi, Y, Sakamoto, T, Umemoto, M, Saito, Y. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor and its receptors in endometrial carcinoma. Gynecol-Oncol. 2000; 77:413-418.