

ALINE MARQUES DOS SANTOS

**PAPEL DA IMUNO-HISTOQUÍMICA NA DISTINÇÃO ENTRE A
HIPERPLASIA PSEUDOEPITELIOMATOSA E O CARCINOMA
ESCAMOSO DE PELE**

**BRASÍLIA
2013**

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

ALINE MARQUES DOS SANTOS

**PAPEL DA IMUNO-HISTOQUÍMICA NA DISTINÇÃO ENTRE A
HIPERPLASIA PSEUDOEPITELIOMATOSA E O CARCINOMA
ESCAMOSO DE PELE**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Orientador: Prof^a Dr^a Fabiana Pirani Carneiro

BRASÍLIA
2013

ALINE MARQUES DOS SANTOS

**PAPEL DA IMUNO-HISTOQUÍMICA NA DISTINÇÃO ENTRE A
HIPERPLASIA PSEUDOEPITELIOMATOSA E O CARCINOMA
ESCAMOSO DE PELE**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Aprovado em ____/____/_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dr^a Fabiana Pirani Carneiro
FM - UnB

Prof Dr Albino Verçosa de Magalhães
FM - UnB

Prof Dr Rivadávio Fernandes Batista de Amorim
FM - UnB

Prof^a Dr^a Larissa Cardoso Marinho
PUC-GOIÁS

Dedico este trabalho à minha querida e amada família, Megumi e Clarice, por tornarem a minha vida, a cada dia, mais leve, bela e feliz. Aos meus falecidos pais, Maria Augusta e Francisco, pelo amor que sempre recebi. E aos meus queridos amigos, Maria do Rosário e Joaquim, por sempre estarem ao meu lado na ausência dos meus pais.

AGRADECIMENTOS

A minha querida amiga e orientadora Dr^a Fabiana Pirani Carneiro, por ter me incentivado a ingressar no curso de mestrado e por ter me apoiado, através da sua paciência e de seus conselhos, na condução de mais uma etapa da minha vida acadêmica;

À equipe de professores do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, pelo acolhimento caloroso;

À Tércia Lousa e Herculy Lasite, pela amizade e dedicação na execução dos trabalhos técnicos laboratoriais necessários para pesquisa;

À equipe do Programa de Pós-graduação em Ciências da saúde da Universidade de Brasília, em especial à Edigreis, pelo apoio e orientação;

À Fundação de apoio à pesquisa do Distrito Federal, pelo incentivo financeiro;

Ao Dr Alexandre Cavalca, por permitir o meu acesso ao Centro de Anatomia Patológica do Hospital Universitário de Brasília;

A toda equipe do Centro de Anatomia Patológica do Hospital Universitário de Brasília, pela cooperação com a coleta de dados, em especial ao meu amigo Valmir, pelo auxílio na localização de lâminas e blocos arquivados;

Aos meus queridos amigos, Dr. Emanuel Damasceno e Amadeu Queiroz, pela colaboração e comprometimento na coleta de dados;

Aos meus colegas de serviço do Hospital Regional de Taguatinga, por tantas palavras de conforto e ânimo;

Ao meu querido amigo Dr. Carlos Chaveiro, pelos sábios conselhos;

Aos meus irmãos, tios e tias, que participaram e colaboraram com a minha educação e estudos, e que sempre torceram e acreditaram em mim;

A minha saudosa amiga Dr^a Maria Ophélia Galvão, por me incentivar a participar do mundo acadêmico.

RESUMO

A hiperplasia pseudoepiteliomatosa (HPE) possui características histopatológicas que podem ser confundidas com o carcinoma de células escamosas (CCE). Nem sempre as diferenças morfológicas entre essas lesões são claras nos exames de rotina anatomopatológicos. O objetivo desse estudo foi a análise da expressão da laminina-5 (L5), proteína 16 (p16) e E-caderina (E-cad) na distinção entre a HPE e o CCE de pele. A amostra foi selecionada a partir de blocos de parafina arquivados no Centro de Anatomia Patológica do Hospital Universitário de Brasília (HUB), com diagnósticos de HPE (em casos de leishmaniose tegumentar e cromoblastomicose), ceratose actínica (CA)/Carcinoma *in situ* (Cis) e CCE de pele. Todos os casos apresentaram áreas representativas da lesão e da pele adjacente. Os dados clínicos foram obtidos de dados do prontuário do arquivo médico do HUB. O estudo imuno-histoquímico de L5, p16 e E-cad foi realizado em todos os casos. O teste de Fisher foi aplicado na análise estatística ($p < 0,05$). Foram analisadas 62 amostras, representadas por 18 casos de HPE; 16 casos de CA/Cis; e 28 casos de CCE (8 eram CCE microinvasores). A L5 foi positiva em 84,21% das amostras de HPE e teve sua expressão concentrada na periferia dos cones interpapilares alongados, em ninhos de células escamosas isolados na derme, em áreas de ulceração e em células isoladas migratórias na derme. Nas amostras de CA/Cis, 37,5% dos casos foram positivos para L5. Todos os casos de CCE foram positivos para a L5. Nas amostras de CCE francamente invasores, a L5 teve expressão fortemente positiva nas células da periferia dos blocos invasivos de tumor, em áreas bem diferenciadas, e positividade difusa, em áreas menos diferenciadas. Nos CCE microinvasores, a L5 apresentou forte concentração nas células da frente de invasão. Não houve diferença estatística entre a expressão de L5 nas amostras de CEC invasivo e HPE ($p=0,1478$). Nas amostras de HPE, CA/Cis e CCE, houve positividade para p16 em 11,11%, 75% e 57,14% dos casos, respectivamente. A expressão de p16 foi mais frequente nas amostras de CEC invasivo do que nas de HPE ($p=0,021$), mas mostrou-se pouco sensível. Nas amostras de HPE, CA/Cis e CCE, houve perda parcial da expressão da E-cad em 77,77%, 93,75% e 100% dos casos, respectivamente. A perda parcial da expressão de E-cad foi mais frequente nas amostras de CEC invasivo do que nas de HPE ($p=0,0188$), mas mostrou-se pouco específica. Concluindo, os achados do presente estudo demonstraram que a frequência e o padrão de marcação da L5 são semelhantes na HPE, CCE microinvasor e CCE bem diferenciado, sugerindo que esta proteína não seria útil na distinção destas lesões. Com relação à expressão de p16 e à perda parcial da expressão de E-cad, apesar de terem sido significativamente mais frequentes nas amostras de CCE, os resultados sugerem, respectivamente, sensibilidade e especificidade baixas para a detecção das lesões malignas. Logo, estes marcadores não deveriam ser considerados marcadores ideais na diferenciação entre a HPE e o CCE de pele, na rotina diagnóstica.

Palavras-chave: hiperplasia pseudoepiteliomatosa; carcinoma de células escamosas; pele; laminina-5; E-caderina; p16.

ABSTRACT

Pseudoepitheliomatous hyperplasia (PEH) is an epidermal hyperplasia of which the histopathological features may simulate squamous cell carcinoma (SCC). The morphological differences between them are not always clearly on routine pathological examination. The purpose of this study was the analysis of the laminin-5 (L5), protein 16 (p16) and E-cadherin expression in distinction between PEH and cutaneous SCC. The sample was select from paraffin-embedded skin biopsy from the files of the Pathologic anatomy center of the University Hospital of Brasília (UHB), with the diagnosis of PEH (in samples of tegumentar leishmaniasis and chromoblastomycosis), actinic keratosis (AK)/carcinoma *in situ* (Cis) and cutaneous SCC. All cases showed representative areas of the lesions and of the contiguous skin. Clinical data were obtained from medical files of UHB. The L5, p16 and E-cad immunohistochemical study was done in all cases. The Fisher's test was used in statistical analysis ($p < 0.05$). A total of 62 samples were analysed, represented by 18 cases of PEH; 16 cases of AK/Cis; and 28 cases of SCC (8 were microinvasive carcinoma). L5 was positive in 84.21% of PEH samples and its expression was concentrated in peripheral cells of elongated rete pegs, in isolated nests of cells in dermis, in adjacent areas to ulceration and in migrating isolated cells in dermis. In KA/Cis samples, 37.5% of the cases were positives for L5. In SCC samples, all cases were positives for L5. In frankly invasive SCC samples, L5 was positive in peripheral cells tumor nests, in well-differentiated areas, and it was diffusely positive in less differentiated areas. In microinvasive SCC samples, L5 was concentrated in the invasion front of the neoplasia. There wasn't statistical difference between the L5 expression in invasive SCC and PEH samples ($p=0.1478$). In PEH, AK/Cis and SCC samples, p16 was positive in 11.11%, 75% and 57.14% of the cases, respectively. The p16 expression was more frequently in invasive SCC samples than in PEH samples ($p=0.021$), but it was poorly sensitive. In PEH, AK/Cis and SCC samples, there was partial loss of E-cad in 77.77%, 93.75% and 100% of the cases, respectively. The partial loss of the E-cad expression was more frequently in invasive SCC samples than in PEH samples ($p=0.0188$), but it was poorly specific. In conclusion, the findings of that present study showed that the frequency and the L5 expression pattern are similar in PEH, microinvasive SCC and well-differentiated SCC of the skin, suggesting that L5 wouldn't be a useful marker in the distinction of these two lesions. In relation to p16 expression and to E-cad partial lost, despite they were significantly more frequently in SCC samples, the results suggest, respectively, low sensitivity and low specificity in the detection of malignant lesions. Thus, these markers shouldn't be considered ideal in distinction between PEH and cutaneous SCC, at diagnostic routine.

Key words: pseudoepitheliomatous hyperplasia; squamous cell carcinoma; skin; laminin-5; E-cadherin; p16.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Características histopatológicas e imuno-histoquímicas das amostras de HPE.....	35
Figura 2	Expressão imuno-histoquímica da L5 nas amostras de lesões pré-malignas e de CCE.....	36
Figura 3	Expressão imuno-histoquímica de p16 nas amostras de HPE e de lesões pré-malignas.....	39
Figura 4	Expressão imuno-histoquímica de p16 nas amostras de CCE.....	40
Figura 5	Expressão imuno-histoquímica da E-cad nas amostras de HPE e de lesões pré-malignas.....	42
Figura 6	Expressão imuno-histoquímica da E-cad nas amostras CCE.....	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Distribuição das lesões quanto ao gênero e idade dos pacientes e presença de ulceração.....	30
Tabela 2	Distribuição das lesões de HPE quanto à localização.....	31
Tabela 3	Distribuição das lesões de CCE e CA/Cis quanto à localização, recidiva, comprometimento linfonodal e metástase.....	32
Tabela 4	Expressão imuno-histoquímica da Laminina-5 nas lesões de HPE, CA/Cis e CCE.....	33
Tabela 5	Expressão imuno-histoquímica de p16 nas lesões de HPE, CA/Cis e CCE.....	37
Tabela 6	Expressão imuno-histoquímica da E-caderina nas lesões de HPE, CA/Cis e CCE.....	41
Tabela 7	Características clínicas das amostras estudadas de hiperplasia pseudoepiteliomatosa.....	71
Tabela 8	Características clínicas das amostras estudadas de lesões pré-malignas.....	71
Tabela 9	Características clínicas das amostras estudadas de carcinoma de células escamosas.....	72
Tabela 10	Características imuno-histoquímicas das amostras de hiperplasia pseudo epiteliomatosa.....	73
Tabela 11	Características imuno-histoquímicas das amostras de lesões pré-malignas.....	73
Tabela 12	Características imuno-histoquímicas das amostras de carcinoma de células escamosas.....	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADN	ácido desoxirribonucléico
bcl-2	proteína 2 de linfoma de células B
CA/Cis	ceratose actínica/carcinoma <i>in situ</i>
CCE	carcinoma de células escamosas
CD	catepsina D
CD 1a	glicoproteína de superfície celular expressa em timócitos corticais, células dendríticas da derme e células de Langerhans
CD30	antígeno de superfície celular
c-Kit	quinase proteína tirosina
DB	doença de Bowen
E-cad	caderina epitelial
<i>et al</i>	e colaboradores
FCE	fator de crescimento epitelial
FCQ	fator de crescimento de queratinócitos
FCT	fator de células-tronco
FCT- α	fator de crescimento tumoral- α
FNT- α	fator de necrose tumoral- α
G1	fase do ciclo celular em que ocorre crescimento celular
HPE	hiperplasia pseudoepiteliomatosa
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
IL-4	interleucina-4
INF- γ	interferon- γ
INK4a	gene supressor de tumor
KA	keratoacantoma
Ki-67	proteína nuclear marcadora de proliferação celular
L5	laminina 5
LIEAG	lesão intraepitelial escamosa de alto grau
M	média
MB	membrana basal
mm	milímetro

MP	metaloproteinase
N	amostra
NA	não analisado
NIC 3	neoplasia intraepitelial cervical grau 3
p16	proteína 16
p21	proteína 21
p53	proteína 53
pH	potencial de hidrogênio
pRb	proteína de supressão tumoral do retinoblastoma
PVH	papiloma vírus humano
RFCE	receptor do fator de crescimento epitelial
RUV	radiação ultravioleta
SE	sem especificação
Th1	linfócitos T <i>helper</i> tipo 1
UAP	uroquinase ativadora de plasminogênio
µm	micrômetro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
1.1	PATOGÊNESE.....	14
1.2	HISTOPATOLOGIA.....	17
1.3	MARCADORES IMUNO-HISTOQUÍMICOS ENVOLVIDOS NO DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL ENTRE A HPE E O CCE.....	20
1.4	BIOMARCADORES ESPECIAIS.....	23
2	OBJETIVOS.....	25
3	METODOLOGIA.....	26
3.1	ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO.....	27
3.2	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	29
4	RESULTADOS.....	30
4.1	EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DA LAMININA-5.....	33
4.2	EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DA PROTEÍNA 16.....	37
4.3	EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DA E-CADERINA.....	41
5	DISCUSSÃO.....	44
6	CONCLUSÃO.....	57
	REFERÊNCIAS	58
	APÊNDICE.....	69
	ANEXO.....	78

1 INTRODUÇÃO

A hiperplasia pseudoepiteliomatosa (HPE), também conhecida como hiperplasia pseudocarcinomatosa (1,2), hiperplasia escamosa pseudoepiteliomatosa (3) e hiperplasia epidérmica invasiva (4) é uma lesão de padrão reativo, que pode acometer superfícies cutâneas e mucosas (5), e pode ser definida como “uma proliferação completamente benigna do epitélio que deve ser histologicamente diferenciada do carcinoma escamoso verdadeiro” (6).

Os relatos mais antigos na literatura foram os descritos por Unna (1896) apud Ju (7)¹, em um caso de lúpus vulgar e por Miyahara (1911) apud Ju (7)², em uma série de casos de lúpus vulgar e escrofuloderma.

É secundária a um processo subjacente (6), normalmente identificável (8) e pode ser encontrada em inúmeras doenças distintas, classificadas em quatro grandes grupos: infecções; neoplasia; dermatoses com inflamação crônica e irritação; e uma miscelânea de outras condições (9).

No primeiro grupo, os exemplos clássicos são as infecções micobacterianas e as fúngicas profundas (9), tais como, aspergilose cutânea (10), paracoccidioidomicose (11) e blastomicose (12). Vale ressaltar também o papel das infecções bacterianas em lesões decorrentes de queimaduras (13) ou associadas à osteomielite crônica (14) e às úlceras crônicas (15). Dentre as infecções parasitárias, um exemplo é a leishmaniose cutânea (16).

No segundo grupo, a HPE encontra-se, por exemplo, associada a linfomas (17,18), carcinoma basocelular (19), melanoma (20), tumor de células granulares (21) e hidroadenoma papilífero (22).

No terceiro grupo, estão presentes afecções, tais quais, lúpus eritematoso hipertrófico (23), prurigo nodular, líquen simples crônico, líquen plano hipertrófico, pênfigo vegetante, líquen escleroso, pioderma gangrenoso (5) e halogenodermas (9).

No último e quarto grupo, observa-se a HPE associada a outras condições distintas das demais previamente citadas, tais como, tatuagens (24).

¹ Unna PG. The histopathology of the diseases of the skin. Translate by N. Walker, New York: Macmillan and company; 1896:586

² Miahara M. Zur frage der atypischen epithelwucherungen beim lupus und ihrer beziehungen zum karzinom. Frankfurt ztschr f path. 1911; 9: 176-178.

A HPE clinicamente se apresenta como placa bem definida ou nódulo com graus variáveis de escamas e crostas. Quando a hiperplasia epitelial é exuberante, ela corresponde à lesão vegetativa ou verrucoide, frequentemente observada. Ulceração pode estar presente. Pápulas ou nódulos podem variar de menos de 1 cm, por exemplo, em associação com tumor de células da granulosa, a vários centímetros de diâmetro, o que é visto em halogenoderma e em infecções fúngicas profundas. As lesões com HPE são usualmente da cor da pele ou róseo amarronzadas (9).

A HPE pode ser pigmentada, quando associada a melanoma (25), e aumentar de tamanho ou regredir espontaneamente (7, 17). Pode apresentar crescimento rápido em tatuagens, gerando dúvida diagnóstica com o carcinoma de células escamosas (CCE) (26).

1.1 PATOGÊNESE

O epitélio, na HPE, pode responder às injúrias de duas formas: através da proliferação de células basaloides ou da proliferação de células escamosas, mantendo o amadurecimento dos queratinócitos (6, 27).

Através da análise microscópica de cortes histológicos corados com hematoxilina e eosina, autores de vários estudos procuraram associar o desenvolvimento da HPE com as estruturas cutâneas, numa tentativa de determinar a sua origem (13, 16, 20, 28, 29, 30). Para alguns autores, a HPE seria uma acantose do epitélio das estruturas anexiais, o que explicaria a presença de ilhas de células epiteliais localizadas profundamente na derme (6, 28). Contudo, Freeman não descarta que, em alguns casos, ela poderia ser decorrente de uma combinação entre a epiderme e os seus anexos (28). Já outros autores acreditam que a HPE representaria uma metaplasia escamosa do ducto das glândulas écrinas (10, 20), ou que a origem desse padrão de lesão seria a própria epiderme (30), ou ainda que tanto a epiderme quanto seus apêndices poderiam levar ao desenvolvimento da HPE (9, 13, 24, 27). Assim sendo, os dados de vários estudos mostram que esse padrão de lesão pode ter origem a partir do epitélio interfolicular, unidades foliculares ou écrinas (5, 13, 16).

Alguns estudos propõem que a HPE seria uma resposta fisiológica a algum tipo de material estranho ao corpo, sendo, portanto, responsável pela eliminação

transepidérmica ativa de patógenos, células inflamatórias e elementos dérmicos indesejáveis, tais como fragmentos de elastina, corpos estranhos ou materiais necróticos (4, 16). Esse mecanismo ocorreria pela expansão do epitélio hiperplásico, circundando o material dérmico ofensivo (4, 31). À medida que ocorreria o amadurecimento dos queratinócitos, esse material seria expelido da lesão (31).

Outros autores sugerem ainda que essas estruturas indesejáveis seriam de fato o gatilho que daria início ao desenvolvimento da hiperplasia reacional da epiderme (23).

Levando-se em conta a associação entre a HPE e o processo inflamatório, é importante enfatizar o papel dos fatores de crescimento epidermotróficos, em conjunto com as citocinas inflamatórias, na atuação na inflamação dérmica e na proliferação epidérmica (16), agindo como moduladores autócrinos e parácrinos (32).

Assim, postula-se que a desregulação de alguns desses fatores, tais quais o Fator de crescimento epitelial (FCE), o Fator de crescimento tumoral- α (FCT- α) e o Receptor do fator de crescimento epitelial (RFCE), esteja associada à formação da HPE (18).

Courville et al. (33), através da avaliação imuno-histoquímica de biópsias de pacientes com linfomas cutâneos de células T, sugerem que os FCE e FCT- α são secretados por células T linfomatosas e podem induzir, em alguns casos, a uma hiperexpressão epidérmica de RFCE, o qual estaria associado à HPE.

Contudo, Scarisbrick et al. (18) obtiveram resultados diferentes e até mesmo contrastantes em casos de linfomas cutâneos primários CD30 positivo e de papulose linfomatoide. Neste estudo, a expressão do RFCE pelo epitélio proliferado foi similar a da epiderme normal adjacente e não houve expressão aberrante de FCE, FCT- α e RFCE pelos linfócitos atípicos.

Mott et al. (27) também não evidenciaram uma expressão aumentada de RFCE em queratinócitos associados à HPE em casos de melanoma. O estudo de Barkan et al. (21) demonstraram, em casos de tumor de células granulosas, expressão similar de FCE, FCT- α e RFCE na HPE e no epitélio normal. Contudo, houve um aumento da expressão de FCT- α nas células neoplásicas, enfatizando, portanto, o possível papel deste fator no desenvolvimento da HPE.

Akilov et al. (16), em estudo de leishmaniose cutânea experimental, observaram que a HPE se desenvolveu exclusivamente em um contexto de resposta

inflamatória com linfócitos T *helper* tipo 1 (Th1). Foi evidenciado o aumento da expressão de Interferon- γ (INF- γ) e de Fator de necrose tumoral- α (FNT- α), ambos com concentração mais intensa logo abaixo das lesões. Houve uma diminuição da Interleucina-4 (IL-4). Além disso, observou-se a associação dessas citocinas com o aumento da expressão do Fator de crescimento de queratinócitos (FCQ) e de seu receptor, possivelmente levando a hiperplasia anormal de queratinócitos.

Fu et al. (13), analisando casos de HPE após lesões de pele por traumas e queimaduras, encontraram um aumento da expressão imuno-histoquímica do Fator de células-tronco (FCT), no epitélio das glândulas sudoríparas e nas células do interstício, e de seu receptor tirosina-quinase c-Kit, nas células intersticiais. Eles propuseram, então, que o FCT poderia atuar na proliferação de queratinócitos e de células intersticiais e na transdiferenciação das células intersticiais em células epiteliais, o que levaria a extensão celular epidérmica na derme, formando assim cordões de células epiteliais e dando origem a HPE.

Gattuso et al. (34) sugerem, a partir de análise de ácido desoxirribonucleico (ADN) por citometria de fluxo em biópsias provenientes de úlceras crônicas, que a HPE pode estar associada ao desenvolvimento do CCE, em um subgrupo pequeno dessas lesões (em torno de 1%). Isso ocorreria pela “ativação” de queratinócitos associada a um contexto de inflamação crônica.

A despeito da HPE ser um fenômeno bem conhecido e dos numerosos estudos já realizados, os seus aspectos moleculares e bioquímicos ainda são um mistério (5, 9, 16, 27, 28).

1.2 HISTOPATOLOGIA

A HPE é uma “hiperplasia epidérmica com cordões irregulares de células epiteliais extendendo-se para a derme e apresentando graus variáveis de hiperkeratose e papilomatose” (27)

White e Weidmann (35), em 1926, descreveram a HPE e classificaram-na em três graus, de acordo com os seguintes critérios: características imaturas das células hiperplásicas localizadas nas extensões mais profundas das lesões; a profundidade de penetração das células epiteliais no córion; integridade da membrana basal (MB); figuras de mitoses e presença de pérolas córneas, ambas as últimas consideradas critérios menores.

O grau 1 mostra o início das alterações hiperplásicas, caracterizadas pela acantose, com os cones interpapilares alcançando o nível das glândulas sudoríparas. A MB está intacta e as células epiteliais não têm características imaturas. Pode haver figuras de mitose.

O grau 2 mostra uma proliferação mais irregular dos cones interpapilares, evidenciando o epitélio em porções mais profundas da derme, com as células assumindo uma característica mais imatura. Pode ou não haver pérolas córneas. A MB pode parecer mal definida em algumas áreas.

O grau 3 mostra histopatologia semelhante a do CCE em alguns casos, sendo necessária a correlação com dados clínicos e avaliação de metástase.

A própria descrição histopatológica da HPE traz à tona a sua semelhança com o CCE, evidenciando a necessidade de diferenciar essas duas entidades.

Grunwald et al. (6) elaboraram uma lista de critérios para diferenciar a HPE do CCE. Segundo eles, a HPE é uma proliferação predominantemente do epitélio anaxial, sempre secundária a uma condição subjacente e frequentemente associada a um processo inflamatório granulomatoso; geralmente é confinada a derme papilar, mas pode se estender à derme reticular, sem, contudo, alcançar o tecido subcutâneo; pode apresentar discreto desarranjo epitelial e atipia citológica, em geral na periferia dos agregados; não apresenta macronúcleos nem células epiteliais multinucleadas; possui raras figuras de mitoses, nenhuma delas atípicas; apresenta raramente células necróticas individuais e pérolas córneas; e abriga, com frequência, “redemoinhos escamosos”.

Em sua contrapartida, o CCE é sempre primário e surge predominantemente da epiderme; atinge com frequência a derme reticular e pode alcançar os tecidos subcutâneos; pode apresentar desarranjo epitelial e atipia citológica marcantes; possui macronúcleos frequentes, figuras de mitoses (algumas atípicas), células necróticas individuais, células epiteliais multinucleadas e uma tendência a formar pérolas córneas; raramente abriga “redemoinhos escamosos” e processo inflamatório granulomatoso.

Na literatura, há referência a outras características morfológicas diferenciadoras dessas duas afecções (4, 9, 36). Por exemplo, a presença de halos claros perinucleares nas células hiperplásicas (36); as bordas das lesões pontudas na HPE, enquanto que no CCE, elas são bulbosas, irregulares, infiltrativas, circundadas por fibrose dérmica (9); a manutenção da espessura ou aumento da camada granulosa na HPE e diminuída no CCE (9); a presença de células inflamatórias intraepiteliais, especialmente neutrófilos e eosinófilos, que são comuns na HPE e incomuns no CCE (2, 4, 9); a ausência de invasão vascular e perineural na HPE (4, 9).

Também existem dados conflitantes, pois alguns autores referem que a atipia citológica presente na HPE pode ser leve a moderada (1, 10, 18), podendo até mesmo ser encontradas necrose epidérmica e frequentes figuras de mitose (18, 35). Outros estudos afirmam que não pode haver “redemoinhos” de células escamosas na HPE (36) ou que mitoses e núcleos não devem ser utilizados para diferenciar a HPE do CCE (2).

O termo “HPE atípica” é utilizado para descrever lesões proliferativas da epiderme, sem atipia citológica e que invadem partes moles e ossos, podendo apresentar até metástase linfonodal (4). Contudo, acredita-se que esse tipo de lesão seja de fato um CCE bem diferenciado (37).

Sabe-se também que lesões por queimaduras graves e úlceras crônicas (úlceras de Marjolin) são fatores relativamente raros (38, 39), distintos do dano solar, que predispõem a aproximadamente 2% dos CCEs (34) e geralmente levam a uma forma mais agressiva dessa neoplasia (40). Essas afecções, assim como a cromoblastomicose (41) e a leishmaniose (39, 42), podem desenvolver tanto a HPE como o CCE, esse último sendo incomum. Há raros casos em que existe concomitância entre a HPE e o CCE (7, 34, 41), sendo até mesmo sugerida, a progressão da HPE para CCE em um relato de caso de líquen plano vulvar (43).

Apesar de todas essas diferenças morfológicas previamente citadas, a distinção entre ambas as entidades é difícil, pois essas alterações nem sempre estão presentes ou podem ser confundidas com atipias reativas e reparativas, especialmente nos casos em que há ulceração do epitélio (44). Além disso, existem outros fatores limitantes, tais como, ausência de representação da transição entre a pele adjacente e a lesão (45); fragmento tecidual de tamanho exíguo ou superficial (2, 9, 24, 44, 45); denso infiltrado inflamatório no tecido conjuntivo, mascarando os aspectos morfológicos; e orientação inadequada na inclusão do espécime (44, 45).

Na maioria dos casos é necessário que o patologista faça a análise de múltiplos cortes histológicos da lesão, de colorações especiais, além da obtenção de detalhadas informações clínicas e de imagem para chegar a um diagnóstico correto (9). Às vezes, a despeito do esforço do profissional, é preciso a realização de novas biópsias, que incluam a base da lesão e a derme subjacente, para a confirmação ou exclusão de um processo dérmico primário (9, 18).

Essa dificuldade de caracterização da lesão pode resultar em erro diagnóstico e conduta médica inadequada. Nas hiperplasias causadas por processos inflamatórios/infecciosos (11, 12, 35) e em casos de neoplasia subjacente a HPE, como, por exemplo, linfoma (17, 18), o paciente muitas vezes é submetido a terapias desnecessárias (5), deixando de receber o tratamento clínico adequado e podendo até mesmo morrer em decorrência dos procedimentos cirúrgicos (6). Também a não identificação do CCE pode levar a um atraso no diagnóstico e a uma diminuição da sobrevida dos pacientes (15).

1.3 MARCADORES IMUNO-HISTOQUÍMICOS ENVOLVIDOS NO DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL ENTRE A HPE E O CCE

A invasão dos tecidos adjacentes é uma das principais características da neoplasia maligna e ela se concretiza quando o tumor ultrapassa a MB (46). Ela é complexa, envolvendo fatores angiogênicos (neovascularização e vasculogênese), alterações na adesão celular; degradação da matriz extracelular (MB e matriz intersticial); remodelamento do citoesqueleto; e resposta do sistema imunológico (46, 47, 48). O modelo a seguir descrito é aplicado para os tumores sólidos de maneira geral, incluindo os de origem epitelial.

O acúmulo de múltiplas aberrações genéticas leva a uma proliferação clonal de células neoplásicas (48). Essa expansão celular, primeiramente local (*in situ*), exerce uma pressão nos tecidos adjacentes, levando à inflamação. Subsequentemente, há a liberação e ativação de enzimas proteolíticas, dentre as quais se destacam a uroquinase ativadora de plasminogênio (UAP), a catepsina D (CD), a catepsina B e as metaloproteinases (MP). Não se sabe ao certo se as células malignas secretam e/ou estimulam a secreção e ativação de enzimas proteolíticas por outras células, como macrófagos e fibroblastos (46, 47). Essas enzimas promovem a degradação da MB e da matriz extracelular. Uma vez feita a transposição dessas estruturas, pode ocorrer a invasão de tecidos peritumorais, de vasos sanguíneos e linfáticos e o acometimento da circulação sistêmica e de órgãos distantes do sítio primário (47, 48).

Concomitantemente a isso, ocorrem alterações ou mutações das proteínas de superfície e de adesão, como, por exemplo, a E-caderina (E-cad), ou de proteínas associadas, tais como cateninas e integrinas, resultando na diminuição das conexões intercelulares e conseqüentemente aumentando o poder de invasão das células cancerígenas (47, 48, 49). Além disso, essas células passam por alterações estruturais no próprio citoesqueleto, de maneira a adquirirem motilidade (47).

Alterações associadas a fatores de transcrição também estão relacionadas a um aumento da capacidade de invasão dessas células (48).

As moléculas relacionadas ao processo de invasão das neoplasias malignas podem ter a sua expressão aumentada ou diminuída pelas células tumorais ou por células do microambiente tumoral (46, 49, 50), o que as torna potenciais

biomarcadores no diagnóstico, na classificação, no prognóstico e no monitoramento do curso clínico de vários cânceres (47, 48, 49). Elas podem ser utilizadas não apenas para caracterizar uma proliferação epitelial como neoplásica e invasiva, mas também para avaliar a probabilidade de metástase (51-58).

Frente à relevância da distinção entre o CCE e a HPE, métodos de análise alternativos e complementares tornam-se necessários, dentre eles o estudo imunohistoquímico, com ênfase nas moléculas relacionadas ao processo de invasão neoplásica e à transformação maligna celular.

Barsky et al. (59) analisaram, por meio de imunohistoquímica e de imunofluorescência, a expressão do colágeno IV e da laminina, dois dos principais constituintes da MB (60, 61, 62), em tumores invasivos, *in situ* e em lesões benignas pseudocarcinomas provenientes da mama, pele, pâncreas, cólon, útero e próstata. Não houve marcação extracelular nos casos de carcinomas francamente invasivos e nos focos metastáticos. Em alguns carcinomas invasivos bem diferenciados, dentre eles os CCEs, foi evidenciada uma marcação extracelular irregular e focal de colágeno IV e laminina, demonstrando, portanto, uma fragmentação da MB. Nos carcinomas *in situ* (Cis), a MB mostrou-se intacta, exceto em áreas de microinvasão. Nas lesões pseudocarcinomas, dentre elas a HPE da pele, foi observada uma marcação linear e inalterada da MB. Também foi evidenciada uma positividade intracitoplasmática, em células tumorais, da collagenase tipo IV, corroborando com a idéia de que a produção e a secreção de enzimas proteolíticas também sejam funções das células neoplásicas.

Impola et al. (63), analisando o papel das metaloproteinases (MP) em úlceras crônicas por estase venosa com e sem o desenvolvimento de CCE, observaram que a expressão das MP-7, MP-12 e MP-13 foi positiva nas amostras com carcinoma e negativa no epitélio não neoplásico. Além disso, houve a perda da expressão de MP-19 e da proteína 16 (p16), proteína de supressão tumoral, nos ninhos de células invasoras tumorais. Esses dados sugerem que a avaliação dessas MP e da p16 pode auxiliar no diagnóstico entre o CCE e a HPE. Achados semelhantes não foram encontrados na avaliação das MP-1, MP-3, MP-8, MP-9 e MP-10.

Em estudo de HPE e CCE, em amostras provenientes de mucosa de cabeça e pescoço, Zarovnaya et al. (44) evidenciaram dois padrões de marcação imunohistoquímica para p53: uma marcação invasiva, presente nos CCE e nas lesões displásicas, na qual há uma positividade nuclear acometendo toda a espessura do

epitélio; e uma marcação basal benigna, linear, presente nas HPE, na qual a positividade nuclear é limitada às células basais, ocasionalmente acometendo as células adjacentes.

Além disso, Zarovnaya et al. (44) avaliaram a MP-1 e acharam padrões de marcação citoplasmática conforme os padrões de marcação invasiva e basal benigna previamente citados. Esse achado foi discordante dos dados de trabalho anterior (63). Foi feita a análise da E-caderina (E-cad), molécula de adesão da superfície celular, e esta mostrou uma positividade membranosa uniforme e difusa nas células da HPE, enquanto que sua expressão diminuiu ou desapareceu no CCE. A avaliação do colágeno IV mostrou-se inconclusiva. Esse estudo sugere que um painel imuno-histoquímico contendo p53, E-cad e MP-1 seria útil na distinção entre essas duas entidades nos casos de difícil avaliação histológica.

You et al. (64) analisaram a expressão imuno-histoquímica da E-cad, cortactina (proteína que age na regulação da adesão e migração celular) e MP-9, em amostras de HPE e CCE de mucosas de cabeça e pescoço. Nas HPE, a positividade para a E-cad mostrou-se preservada e não houve expressão de cortactina nem de MP-9. Enquanto que nos CCE, houve redução estatisticamente significativa da E-cad; marcação positiva para a cortactina em 38,1% e 20,6% das amostras de CCE incisionais e excisionais, respectivamente; e marcação positiva para a MP-9 em 9,5% e 11,3% dos CCEs incisionais e excisionais, respectivamente. Os autores sugerem que a utilização da E-cad e da cortactina pode ser útil no diagnóstico diferencial entre o CCE e a HPE.

Conforme evidenciada na revisão de literatura feita acima, os dados em relação aos marcadores imuno-histoquímicos estudados para esse entrave diagnóstico são escassos e muitas vezes conflitantes.

1.4 BIOMARCADORES ESPECIAIS

Neste presente estudo será dada ênfase ao estudo de três potenciais biomarcadores ligados ao desenvolvimento neoplásico e à invasão neoplásica: laminina-5 (L5), p16 e E-cad.

A L5 é uma glicoproteína presente na MB da pele e de outros tipos de epitélios, constituída por 3 cadeias, α 3A, β 3 e γ 2, e está associada à estabilidade da junção dermoepidérmica (62). É considerada marcador de invasão e normalmente é sintetizada em níveis baixos pelas células basais do epitélio para manutenção da estrutura da MB (65), mas, nas células invasivas de carcinomas, inclusive nos CCE, há um aumento significativo na sua expressão (66-78). Também está relacionada à migração de queratinócitos em feridas em cicatrização (65, 79).

A p16 é produto do gene INK4a (80), constituinte de uma família de genes supressores tumorais (81), que é localizado no braço curto do cromossomo 9. Essa proteína tem como função se ligar a quinases dependentes de ciclina-D, preservando a função da proteína de supressão tumoral do retinoblastoma (pRb), retendo o ciclo celular na fase G1 (80), não permitindo, assim, a proliferação celular e a consequente transformação maligna (82). Sabe-se que pode haver a mutação e/ou deleção do gene INK4a em diversos cânceres humanos (80). Contudo, pouco se sabe a respeito do papel desse gene na carcinogênese do CCE induzida por radiação ultravioleta (RUV) (81-86). No CCE de pele, tem sido observada marcação imuno-histoquímica distinta da p16, variando desde a ausência da expressão à hiperexpressão anômala de forma mutante dessa proteína (81-91). Associa-se a hiperexpressão proteica, nuclear e citoplasmática, ao *status* da pRb (87, 89).

A E-cad, também denominada caderina epitelial por ser expressa em quase todos os epitélios (92), é constituinte de uma subclasse das caderinas, que são uma família de glicoproteínas localizadas na superfície celular e envolvidas no mecanismo cálcio-dependente de adesão célula-célula ou célula-substrato, participando do controle da morfogênese e da integridade tecidual (93, 94). A E-cad é expressa na superfície celular de queratinócitos, na junção aderente, de todas as camadas da epiderme e dos anexos da pele (92). Nos carcinomas, incluindo o CCE de pele, a redução ou ausência da sua expressão está associada com a invasão

tumoral (92, 94-101), podendo em alguns casos estar associada à diferenciação tumoral (92, 96) e ao desenvolvimento de metástase (99, 101).

Frente à relevância clínica na diferenciação entre a HPE e o CCE, à dificuldade diagnóstica entre essas duas entidades, em exame de microscopia óptica convencional, e à escassez de estudos utilizando outros métodos de análise diagnóstica, a avaliação imuno-histoquímica desses promissores marcadores de invasão neoplásica acima discutidos, L5, E-cad e p16, é uma opção plausível no diagnóstico diferencial entre essas duas condições.

2 OBJETIVOS

O presente trabalho visa a determinar possíveis marcadores imunohistoquímicos que possam ser utilizados na distinção entre a HPE e o CEC de pele na rotina diagnóstica do laboratório de anatomia patológica. Serão analisados os seguintes marcadores relacionados à invasão neoplásica: L5, p16 e E-cad, em amostras de pele com diagnóstico prévio de HPE, Ceratose actínica (CA)/*Cis* e CCE.

3 METODOLOGIA

O presente trabalho é um estudo descritivo, que visa à análise imuno-histoquímica de espécimes de biópsia de pele fixados em formol e incluídos em parafina, de amostras dos anos de 2001 a 2009, arquivadas no Centro de Anatomia Patológica do Hospital Universitário de Brasília, com os diagnósticos de leishmaniose tegumentar e cromoblastomicose associados à HPE, CA/Cis, CCE invasor.

Todas as amostras foram revistas por dois patologistas e tiveram seus diagnósticos confirmados.

Foram utilizados os seguintes critérios de inclusão:

- Biópsias excisionais de CCE invasor, com características histológicas definitivas de malignidade, tais como atipias nucleares, figuras de mitoses atípicas, invasão da derme e metástases. Os casos foram classificados quanto ao grau histológico (bem, moderadamente e pouco diferenciado). Foi considerada microinvasão quando a extensão do tumor na derme foi ≤ 2 mm (44). Os prontuários de tais pacientes foram consultados, buscando-se informações sobre presença ou ausência de linfonodos comprometidos e de metástases.
- Biópsias excisionais de CA/Cis. Foram selecionados os casos de CA com os seguintes diagnósticos: CA bowenoide, hipertrófica ou liquenoide.
- Biópsias incisionais ou excisionais de HPE com relatos de regressão da lesão após tratamento clínico até 2009. Foram selecionados os pacientes com dados clínicos e epidemiológicos suspeitos e pelo menos um exame laboratorial positivo para leishmaniose cutânea (imunofluorescência indireta, Teste de Montenegro e/ou biópsia) e cromoblastomicose (biópsia com ou sem cultura). A HPE foi definida como uma proliferação exuberante e irregular da epiderme em direção à derme, com alongamento dos cones interpapilares, correspondendo à representação dos graus 2 e 3 de White e Weidmann (35). Os prontuários de tais pacientes foram consultados, buscando-se as

informações acima descritas e se houve desenvolvimento subsequente ou não de CCE nessas lesões.

Foram utilizados os seguintes critérios de exclusão:

- Amostras sem áreas representativas das lesões ou de pele normal adjacente na mesma lâmina.

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de ética em pesquisa em seres humanos da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília (parecer em ANEXO).

3.1 ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO

Para a realização do estudo imuno-histoquímico, foi utilizado o método da estreptavidina-biotina-peroxidase nas secções de tecido, obtidas a partir de material fixado em formol e incluído em parafina, com a finalidade de pesquisar a expressão de L5, E-cad e p16.

As lâminas silanizadas, contendo cortes histológicos com espessura de 4µm, foram desparafinizadas e re-hidratadas.

Para a recuperação antigênica, os cortes foram incubados por 30 a 40 minutos em vaporizador a 95°C com solução tampão (citrato + *tween* 20) de pH 6.0. Logo após, as lâminas foram resfriadas em temperatura ambiente por 15 minutos e, em seguida, lavadas com água destilada.

Para a inativação da peroxidase tecidual endógena, as lâminas foram imersas em uma solução de Peróxido de hidrogênio (H₂O₂), na proporção de 25,5 ml por 230 ml de água destilada, em temperatura ambiente por 20 minutos. Depois disso, foram lavadas com solução tampão fosfato-salino e incubadas com o anticorpo primário durante a noite, à 4°C.

Os anticorpos primários utilizados na reação imuno-histoquímica foram: anticorpo monoclonal laminina-5 γ2 (clone 4G1, diluição 1:50; DAKO Corporation, Carpenteria, Califórnia, Estados Unidos da América), anticorpo monoclonal E-caderina (clone NCH-38, diluição 1:50 e 1:100; DAKO Corporation, Carpenteria,

Califórnia, Estados Unidos da América) e anticorpo monoclonal CDKN2A/p16INK4a (clone DCS-50, diluição 1:200; Abcam).

Após lavar as lâminas com solução tampão fosfato-salino, elas foram incubadas com o anticorpo secundário por 30 minutos em temperatura ambiente e, na sequência, com o complexo estreptavidina-biotina-peroxidase (LSAB+, DAKO A/S, Glostrup, Denmark K-690) por 30 minutos, em temperatura ambiente.

Todas as reações foram reveladas pela solução cromogênica diaminobenzidina. A contracoloração foi feita com hematoxilina de Harris. As lâminas foram então desidratadas, diafanizadas e montadas.

Na análise imuno-histoquímica foram consideradas positivas, para a L5, as células escamosas coradas em marrom no citoplasma. A marcação imuno-histoquímica foi classificada quanto a sua distribuição, difusa ou focal.

Para a E-cad, foram consideradas positivas as células escamosas coradas em marrom na membrana plasmática. A avaliação imuno-histoquímica desse marcador foi classificada da seguinte forma: preservada/normal, quando a marcação positiva é uniforme e similar ao epitélio normal; perda parcial, quando há áreas positivas e negativas; e perda completa, quando não há marcação positiva (102).

E, para p16, foram consideradas positivas as células escamosas coradas em marrom no núcleo com ou sem marcação citoplasmática associada. A marcação imuno-histoquímica foi classificada quanto a sua intensidade, forte ou fraca, e quanto a sua distribuição, difusa ou focal.

Os controles positivos utilizados para L5, E-cad e p16, respectivamente, foram amostras de biópsias com adenocarcinoma colônico, pele adjacente às lesões examinadas (controle interno) e lesão intraepitelial escamosa de alto grau em colo uterino.

3.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada utilizando o *software* GraphPad Prism 6. O teste de Fisher foi usado na análise da distribuição das diferenças de frequência entre os grupos. A significância estatística foi designada para $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

Foram selecionados 72 casos assim distribuídos e classificados: 24 casos de HPE; 20 casos de *CA/Cis*; e 28 casos de CCE. Desses, foram excluídas do trabalho 10 amostras (6 de HPE, 2 de *Cis* e 2 de CCE) por ausência de áreas representativas da lesão ou de pele normal adjacente nos cortes histológicos feitos posteriormente ou por impossibilidade de recuperação antigênica durante o estudo imunohistoquímico. Dois (2) casos diagnosticados previamente como CA, após revisão das lâminas, foram reclassificados como CCE microinvasores e reagrupados dentro dos CCE. Sendo assim, a amostra analisada neste trabalho foi de 62 casos (n total = 62), representada por 18 casos de HPE (n = 18); 16 casos de *CA/Cis* (n = 16); e 28 casos de CCE (n = 28). Dos casos de CCE, 8 são CCE microinvasores (n = 8) e 20 (n = 20) são CCE francamente invasores. Os resultados aqui apresentados encontram-se detalhados no APÊNDICE

Nas amostras de HPE e CCE, conforme detalhado na tabela 1, observou-se um predomínio do acometimento do gênero masculino em 88,88% e 67,85% dos casos, respectivamente. Nas lesões precursoras *CA/Cis*, a distribuição da amostra entre homens e mulheres foi semelhante (50% para cada). A média de idade para a HPE, *CA/Cis* e CCE foi de 41, 63 e 64 anos, respectivamente.

Todas as amostras de HPE, clinicamente, apresentaram ulceração. Esse achado também foi evidenciado em 60,71% dos casos de CCE e em 12,5% dos casos de *CA/Cis* (Tabela 1).

Tabela 1 -- Distribuição das lesões quanto ao gênero, idade dos pacientes e presença de ulceração

Lesões	Gênero		Idade (anos) Média (M)	Ulceração
	Masculino	Feminino		
HPE (n=18)	16 (88,88%)	2 (11,11%)	8-74 M=41	18 (100%)
<i>CA/Cis</i> (n=16)	8 (50%)	8 (50%)	36-89 M=63	2 (12,5%)
CCE (n=28)	19 (67,85%)	9 (32,14%)	30-93 M=64	17 (60,71%)

HPE: hiperplasia pseudoepiteliomatosa; *CA/Cis*: ceratose actínica/carcinoma in situ; CCE: carcinoma de células escamosas.

Nas amostras de HPE, os membros inferiores foram os locais de maior frequência da doença, compreendendo 50% dos casos. Em ordem decrescente, as outras localizações acometidas foram os membros superiores (22,22%), a face (11,11%) e o dorso (11,11%) (Tabela 2). Em uma das amostras, não foi possível

determinar o local da lesão, pois esse dado não foi especificado no laudo da biópsia e o prontuário não foi localizado.

Tabela 2 -- Distribuição das lesões de HPE quanto à localização

Localização	HPE
Face	2 (11,11%)
Membros superiores	4 (22,22%)
Membros inferiores	9 (50%)
Dorso	2 (11,11%)
Não especificada	1 (5,55%)
TOTAL	18 (100%)

HPE: hiperplasia pseudoepiteliomatosa.

Não houve relato de desenvolvimento subsequente de CCE ou de lesões precursoras em áreas de lesões com HPE no seguimento dos pacientes.

As amostras de CCE foram classificadas quanto ao grau de diferenciação tumoral. Dos 28 casos, 15 (53,57%) foram considerados bem diferenciados, 11 (39,28%) moderadamente diferenciados e 2 (7,14%) pouco diferenciados. Vinte (20) casos eram francamente invasores (71,42%) e 8 (28,57%) foram avaliados como microinvasores.

As localizações mais frequentes dos CCE foram a face, com 39,28%, os membros superiores, com 14,28%, e membros inferiores, com 14,28% (tabela 3). Em 6 casos (21,42%), observou-se recidiva tumoral local. Houve comprometimento linfonodal em 4 amostras (14,28%) e presença de metástases para órgãos viscerais em 5 casos (17,85%), sendo 2 para fígado, 2 para pulmão e um caso sem especificação do local nos dados do prontuário. Quatro (4) pacientes com CCE apresentaram outras doenças associadas: 2 deles com albinismo; um com epidermodisplasia verruciforme; e um com xerodermia. Dois (2) pacientes referiram história de lesão prévia no local do tumor (queimadura prévia e mordida de rato).

A face (31,25%) foi a localização mais acometida nas lesões precursoras CA/Cis, seguida, em ordem decrescente, dos membros superiores, pescoço, tórax, membros inferiores e dorso (Tabela 3). Em 3 casos, não houve especificação do local da lesão na biópsia nem nos dados do prontuário. Apenas 1 caso apresentou recidiva local, com desenvolvimento de CCE bem diferenciado. Não foram evidenciados comprometimento linfonodal nem metástase durante o seguimento desses pacientes.

Tabela 3 -- Distribuição das lesões de CCE e CA/Cis quanto à localização, recidiva, comprometimento linfonodal e metástase

	CCE	CA/Cis
Localização		
Face	11 (39,28%)	5 (31,25%)
Membros superiores	4 (14,28%)	2 (12,5%)
Membros inferiores	4 (14,28%)	1 (6,25%)
Tórax	2 (7,14%)	2 (12,5%)
Dorso	2 (7,14%)	1 (6,25%)
Pescoço	0 (0%)	2 (12,5%)
Não especificada	5 (17,85%)	3 (18,75%)
TOTAL	28 (100%)	16 (100%)
Recidiva		
	6 (21,42%)	1 (6,25%)
TOTAL	6 (21,42%)	1 (6,25%)
Comprometimento linfonodal		
	4 (14,28%)	0 (0%)
TOTAL	4 (14,28%)	0 (0%)
Metástase		
Pulmão	2 (7,14%)	0 (0%)
Fígado	2 (7,14%)	0 (0%)
Não especificado	1 (3,57%)	0 (0%)
TOTAL	5 (17,85%)	0 (0%)

CA/Cis: ceratose actínica/carcinoma in situ; CCE: carcinoma de células escamosas.

Dos 4 casos de comprometimento linfonodal (Tabela 3) por carcinoma, 2 eram de CCE bem diferenciado e os outros 2 eram de lesões com diferenciação tumoral moderada.

Dos 5 casos de metástase (Tabela 3), 2 eram de CCE bem diferenciado, 2 eram de lesões com diferenciação tumoral moderada e 1 era de CCE pouco diferenciado.

A avaliação epidemiológica de 3 pacientes foi prejudicada, pois os prontuários dos mesmos não foram localizados no arquivo, tendo sido utilizados apenas os dados preenchidos na requisição da solicitação de biópsia.

4.1 EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DA LAMININA-5

Tabela 4 -- Expressão imuno-histoquímica da L-5 nas lesões de HPE, CA/Cis e CCE

Expressão imuno-histoquímica da laminina	HPE	CA/Cis	CCE invasor
Positiva focal	12 (66,66%)	3 (18,75%)	10 (35,71%)
Positiva difusa	4 (22,22%)	3 (18,75%)	18 (64,28%)
Negativa	2 (11,11%)	10 (62,5%)	0 (0%)
TOTAL	18 (100%)	16 (100%)	28 (100%)

L5: laminina-5; HPE: hiperplasia pseudoepiteliomatosa; CA/Cis: ceratose actínica/carcinoma in situ; CCE: carcinoma de células escamosas.

Nas amostras de HPE, a L5 foi positiva em 16 dos 18 casos analisados (84,21%) (Tabela 4). Na maioria das amostras (66,66%), esse marcador teve sua expressão imuno-histoquímica focal e concentrada nas células escamosas da periferia nos cones interpapilares alongados e em ninhos de células da epiderme encontrados na derme (Figuras 1A, 1B, 1C, 1D). Já em áreas adjacentes à ulceração, a positividade da L5 foi forte, difusa (Figura 1E) e também observada em células isoladas migratórias na derme (Figura 1F).

Nas lesões precursoras CA/Cis, 6 dos 16 casos analisados (37,5%) obtiveram marcação imuno-histoquímica positiva para L5 (Tabela 4). Essa positividade foi focal, ocorrendo em 3 casos (18,75%) e acometendo células localizadas na periferia da lesão, na interface com a derme (Figura 2A).

Um desses casos com positividade focal para a L5 apresentou, no seguimento, recidiva local com subsequente desenvolvimento de CCE.

Nos outros 3 casos (18,75%), observou-se uma positividade difusa e fraca (Figura 2B). No restante da amostra (62,5%), a L5 foi negativa.

Nas amostras de CCE invasores, todos os casos (100%) foram positivos para a L5 e obtiveram marcação predominantemente difusa (64,28%) (Tabela 4). Nos CCEs francamente invasores (20 casos), observaram-se dois padrões de positividade imuno-histoquímica para a L5: expressão fortemente positiva nas células da periferia dos blocos de tumor em áreas bem diferenciadas da neoplasia (Figura 2C, 2D) e positividade difusa em áreas menos diferenciadas do carcinoma (Figura 2E). Nas 8 amostras de CCE microinvasores analisados, a marcação positiva da L5, a despeito de ser difusa (3 casos) ou focal (5 casos), apresentou forte concentração citoplasmática nas células da frente de invasão da neoplasia (Figura 2F).

Dos 4 casos de comprometimento linfonodal, 3 eram de amostras com padrão de marcação difusa para a L5.

Dos 5 casos com relato de metástase, 4 eram de amostras com padrão de marcação difusa.

A L5 foi negativa na pele adjacente às lesões e na MB.

Não houve diferença estatística entre a expressão (focal e difusa) de L5 nas amostras de CEC invasivo e de HPE ($p=0,1478$, teste de Fisher).

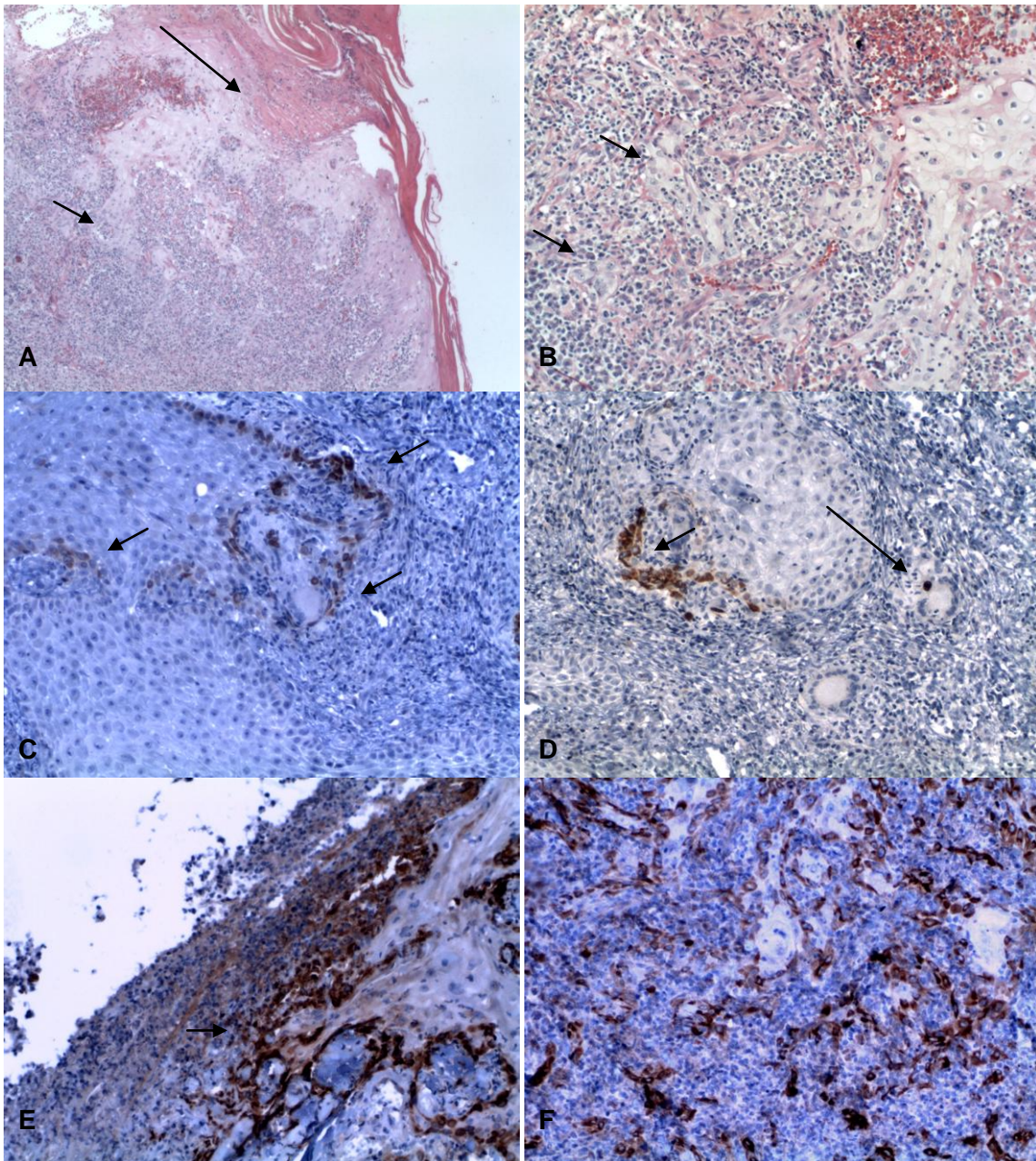


Figura 1. Características histopatológicas e imuno-histoquímicas das amostras HPE. A: proliferação exuberante e irregular da epiderme em direção à derme, apresentando alongamento dos cones interpapilares (seta menor) e ulceração da epiderme (seta maior). HE 40x. B: detalhe da projeção irregular da epiderme na derme, formando ninhos de células escamosas isolados na derme (seta menor), nas HPE. HE 100x. C: positividade imuno-histoquímica focal de L5 nas células escamosas da periferia nos cones interpapilares alongados (seta menor) nas HPE. IHQ 100x. D: positividade imuno-histoquímica focal de L5 nos ninhos de células da epiderme encontrados na derme (seta menor) e estrutura fúngica dentro de célula gigante multinucleada compatível com cromoblastomicose (seta maior), nas HPE. IHQ100x. E: positividade imuno-histoquímica de L5 foi forte e difusa (seta menor) em células escamosas, adjacente à área de ulceração, nas HPE. IHQ 100x. F: positividade imuno-histoquímica difusa de L5 nos queratinócitos isolados migratórios na derme, nas HPE. IHQ 100x.

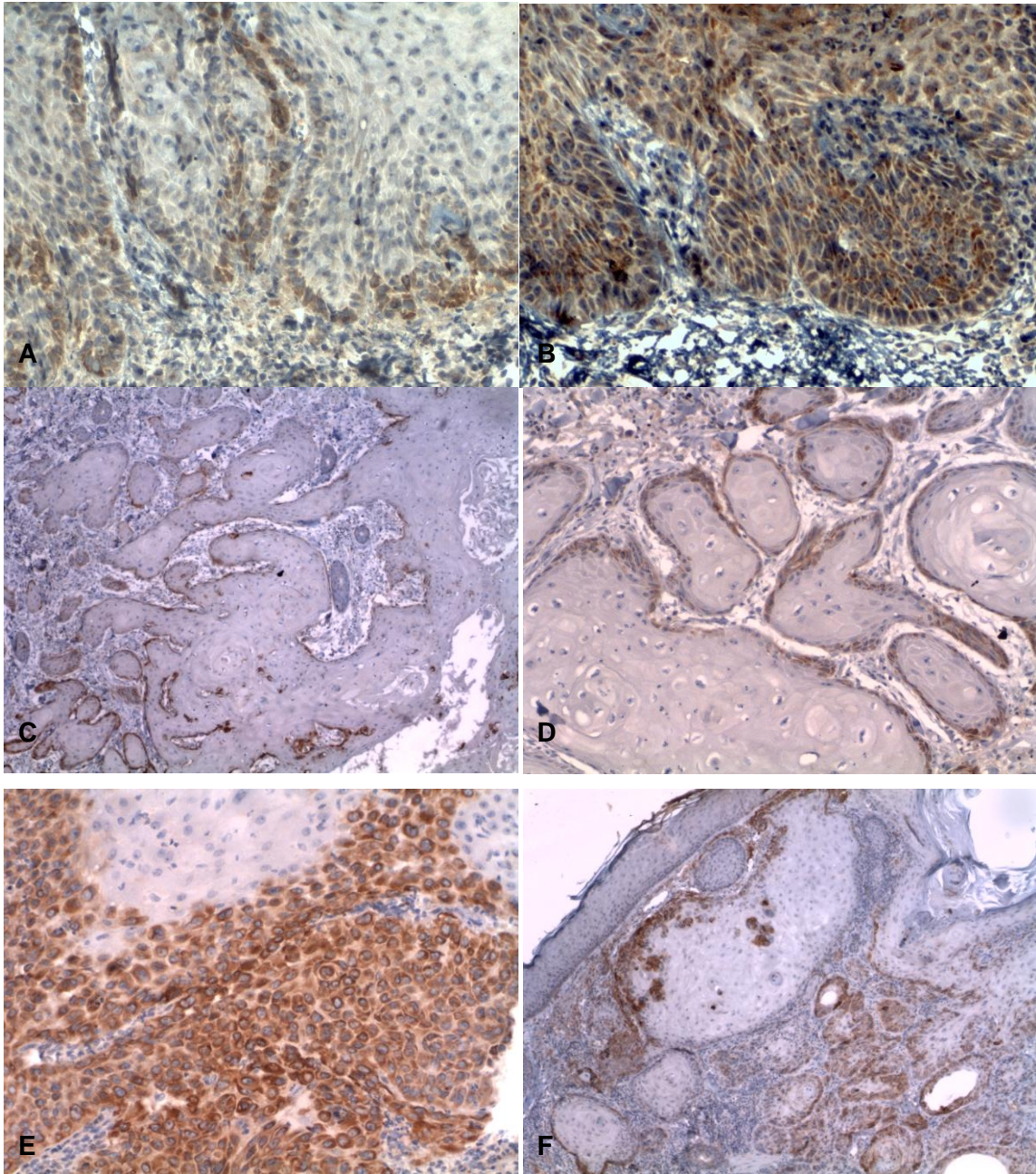


Figura 2. Expressão imuno-histoquímica da L5 nas amostras de lesões pré-malignas e de CCE. A: positividade focal de L5, acometendo células localizadas na periferia da lesão, na interface com a derme. IHQ 100x. B: positividade difusa e fraca de L5 no citoplasma das células neoplásicas. IHQ 100x. C: positividade de L5 nas células da periferia dos blocos de tumor em áreas bem diferenciadas da neoplasia. IHQ 40x. D: Detalhe da expressão de L5 nas células tumorais da periferia das áreas bem diferenciadas do carcinoma. IHQ 100x. E: positividade difusa e forte de L5 em áreas menos diferenciadas do carcinoma. IHQ 100x. F: células tumorais positivas para L5 na frente de invasão dos CCE microinvasores. IHQ 40x.

4.2 EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DA PROTEÍNA 16

Tabela 5 -- Expressão imuno-histoquímica de p16 nas lesões de HPE, CA/Cis e CCE

Expressão imuno-histoquímica do p16	HPE	CA/Cis	CCE invasor
Positiva focal	0 (0%)	4 (25%)	14 (50%)
Positiva difusa	2 (11,11%)	8 (50%)	2 (7,14%)
Negativa	16 (88,88%)	4 (25%)	12 (42,85%)
TOTAL	18 (100%)	16 (100%)	28 (100%)

P16: proteína 16; HPE: hiperplasia pseudoepiteliomatosa; CA/Cis: ceratose actínica/carcinoma in situ; CCE: carcinoma de células escamosas.

A maioria, 88,88% da amostra de HPE (Tabela 5), foi negativa para p16. Não houve positividade na pele adjacente à lesão. Dentre as amostras de HPE, 2 casos (11,11%) dos 18 analisados apresentaram uma positividade difusa e forte para p16 (tabela 5), em pacientes do sexo masculino, com idade de 53 e 56 anos, ambos em membro inferior (Figura 3A). Nesses 2 casos a marcação da L5 foi focal.

Nas lesões precursoras CA/Cis, 12 (75%) dos 16 casos apresentaram marcação positiva para p16, com 8 casos (50%) mostrando positividade difusa e forte (Figuras 3B, 3C) e 4 casos (25%) exibindo positividade focal e fraca (Tabela 5) (Figura 3D).

Foram observados 5 (31,25%) casos de CA/Cis com positividade focal e fraca para p16 na pele adjacente, concentrada nas camadas basal e espinhosa. Todos apresentavam lesão principal positiva para essa proteína.

Nas amostras de CCE invasores (microinvasores e francamente invasores), 16 (57,14%) dos 28 casos apresentaram marcação positiva para p16, com 2 casos (7,14%) mostrando positividade difusa e forte (Figuras 4A, 4B) e 14 casos (50%) exibindo positividade focal e fraca (Tabela 5) (Figuras 4C).

Dos 2 (7,14%) casos de CCE invasor com marcação difusa para p16, um deles tinha história prévia de epidermodisplasia verruciforme.

Foram observados 12 (42,85%) casos de CCE com positividade focal e fraca para p16, concentrada nas camadas basal e espinhosa, em áreas de CA na pele adjacente. Desses, 9 são CCE francamente invasores e positivos para p16, enquanto que 3 (1 microinvasor) são carcinomas negativos para p16.

Dos 4 casos de comprometimento linfonodal, 2 eram de amostras negativas para p16 e os outros 2 eram de amostras positivas para essa proteína (1 caso com marcação difusa e forte e o outro caso com expressão fraca e focal) .

Dos 5 casos com relato de metástase, 3 eram de amostras negativas para p16 e os outros 2 eram de amostras positivas para essa proteína (1 caso com marcação difusa e forte e o outro caso com expressão fraca e focal) .

A expressão (focal e difusa) de p16 foi mais frequente nas amostras de CEC invasivo do que nas de HPE ($p=0,021$, teste de Fisher).

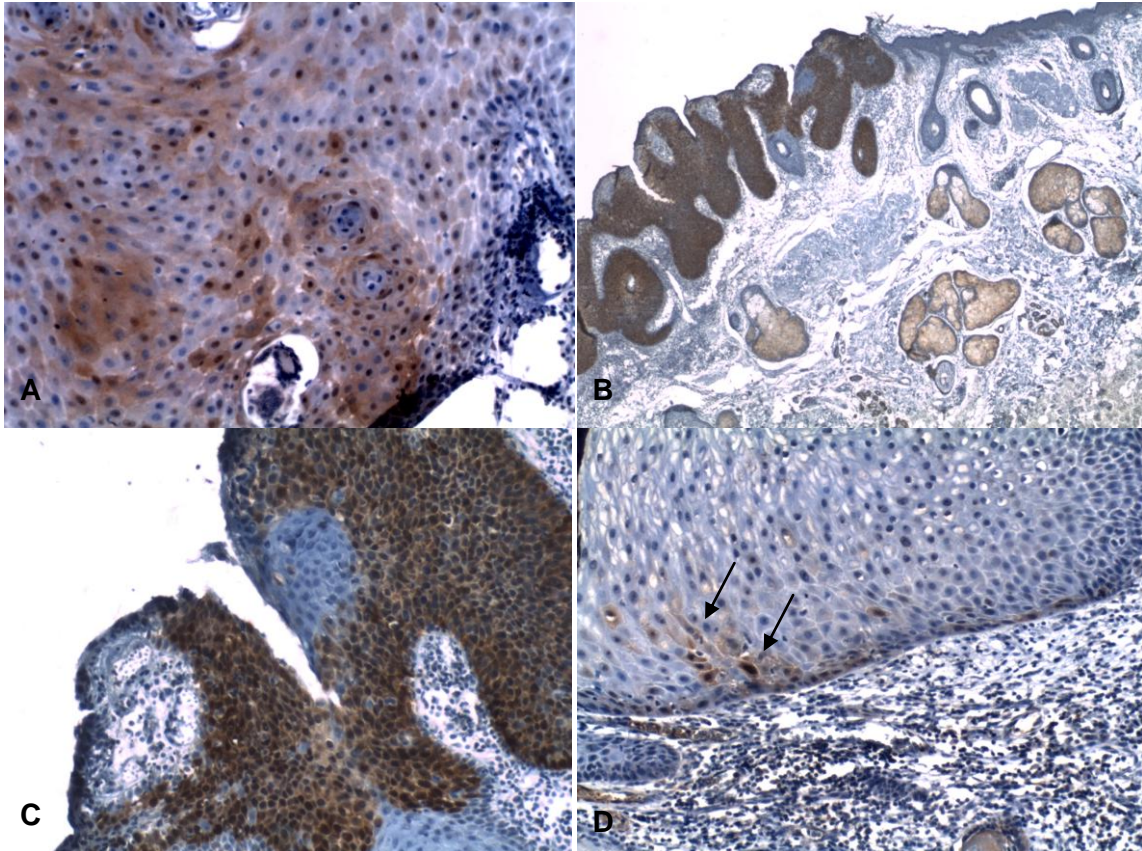


Figura 3. Expressão imuno-histoquímica de p16 nas amostras de HPE e de lesões pré-malignas. A: positividade difusa nuclear e citoplasmática para p16 em amostra de HPE. IHQ 100x. B: positividade difusa e forte, nuclear e citoplasmática, para p16, em amostra de CA/Cis. IHQ 40x. C: detalhe da marcação nuclear e citoplasmática, forte e difusa, de p16, em amostra de CA/Cis. IHQ 100x. D: positividade focal e fraca para p16, em amostra de CA/Cis (setas). IHQ 100x.

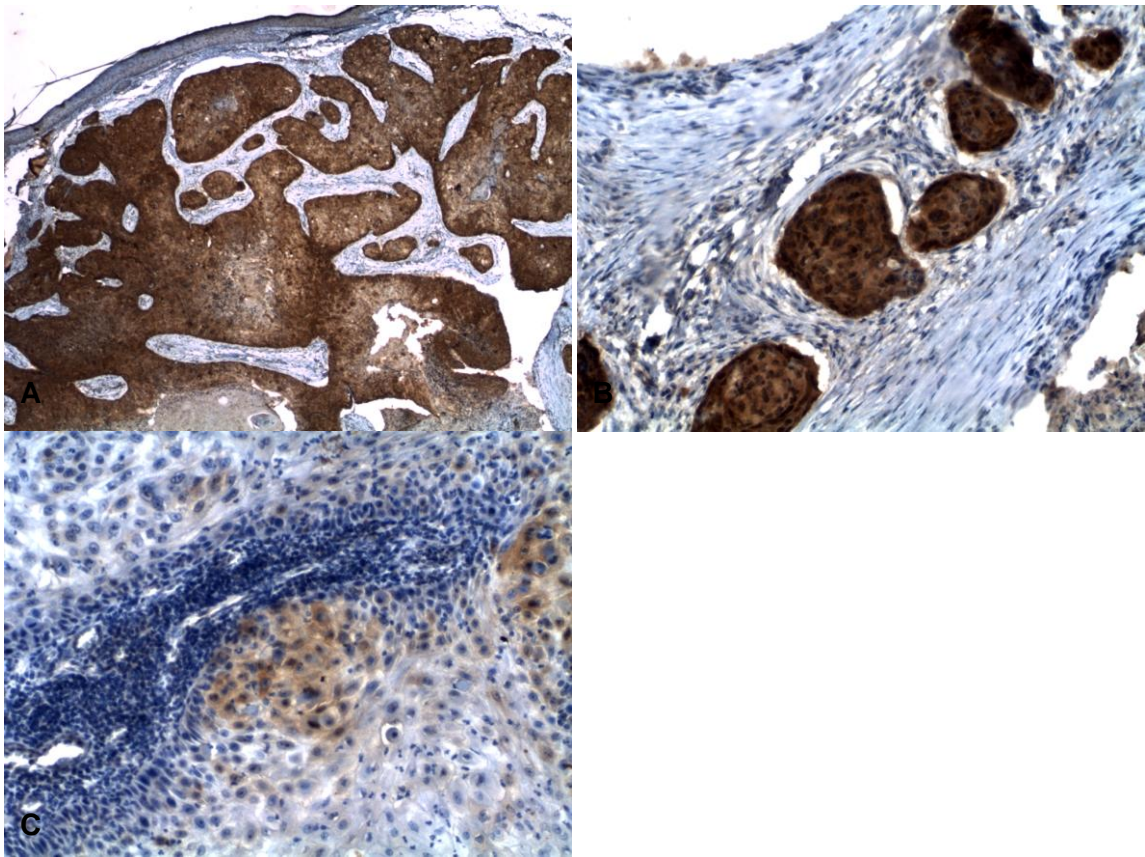


Figura 4. Expressão imuno-histoquímica de p16 nas amostras de CCE. A: marcação forte e difusa de p16. IHQ 20x. B: detalhe da marcação de p16 citoplasmática e nuclear, forte e difusa. IHQ 100x. C: positividade focal e fraca para p16, nuclear e citoplasmática.

4.3 EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DA E-CADERINA

Tabela 6 -- Expressão imuno-histoquímica da E-cad nas lesões de HPE, CA/Cis e CCE

	HPE	CA/Cis	CCE invasor
Preservada	4 (22,22%)	1 (6,25%)	0 (0%)
Perda parcial	14 (77,77%)	15 (93,75%)	28 (100%)
Perda completa	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
TOTAL	18 (100%)	16 (100%)	28 (100%)

E-cad: E-caderina; HPE: hiperplasia pseudoepiteliomatosa; CA/Cis: ceratose actínica/carcinoma in situ; CCE: carcinoma de células escamosas.

Nas amostras de HPE, 14 casos (77,77%) dos 18 analisados apresentaram perda parcial da expressão da E-cad (Figuras 5A, 5B), com áreas de ausência de expressão desse marcador na lesão (Tabela 6). Enquanto que 4 casos obtiveram marcação de E-cad preservada (Figura 5C).

Nas lesões precursoras CA/ Cis (Tabela 6) (Figuras 5D, 5E) apenas 1 caso teve positividade para E-cad preservada. Não houve perda completa dessa proteína nesse grupo de lesões.

Tanto nas HPE quanto nas lesões precursoras CA/Cis, a expressão da E-cad na pele adjacente manteve-se preservada.

Nas amostras de CCE invasores, todos os casos apresentaram perda parcial da expressão imuno-histoquímica da E-cad (Tabela 6). Foram observados dois padrões de expressão da E-cad nos carcinomas: preservação ou marcação mais fraca em grupos de células, nas áreas bem diferenciadas da neoplasia (Figura 6A, 6B), e ausência de expressão ou expressão focal em células isoladas, nas áreas pouco diferenciadas do carcinoma (Figura 6B, 6C, 6D). Em duas amostras de CCE, notou-se a perda parcial da E-cad em áreas de CA na pele adjacente à neoplasia.

Todos os casos com comprometimento linfonodal por CCE e metástase tumoral tiveram perda parcial da expressão de E-cad.

A perda parcial da expressão de E-cad foi mais frequente nas amostras de CEC invasivo do que nas de HPE ($p=0,0188$, teste de Fisher).

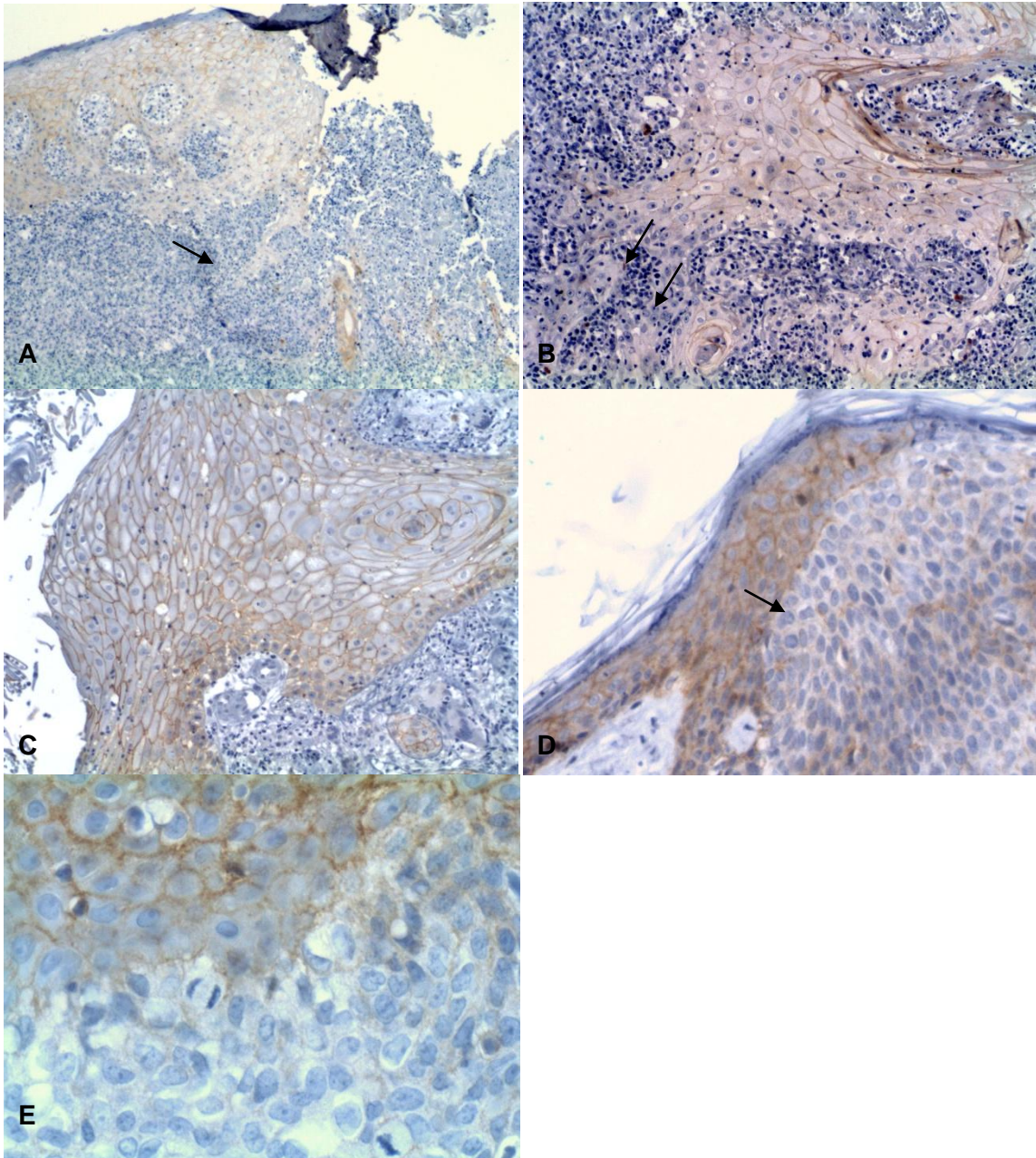


Figura 5. Expressão imuno-histoquímica da E-cad nas amostras de HPE e de lesões pré-malignas. A: perda focal da marcação da membrana citoplasmática para E-cad no alongamento dos cones interpapilares (seta), em HPE. IHQ 40x. B: detalhe da perda focal da E-cad (seta), em HPE. IHQ 100x. C: preservação da expressão imuno-histoquímica de E-cad, em HPE. IHQ 100x. D: perda parcial da expressão de E-cad (seta), em lesões precursoras de carcinoma. IHQ 40x. E: detalhe da perda parcial de E-cad, em lesões precursoras de carcinoma (parte inferior da figura). IHQ 400x.

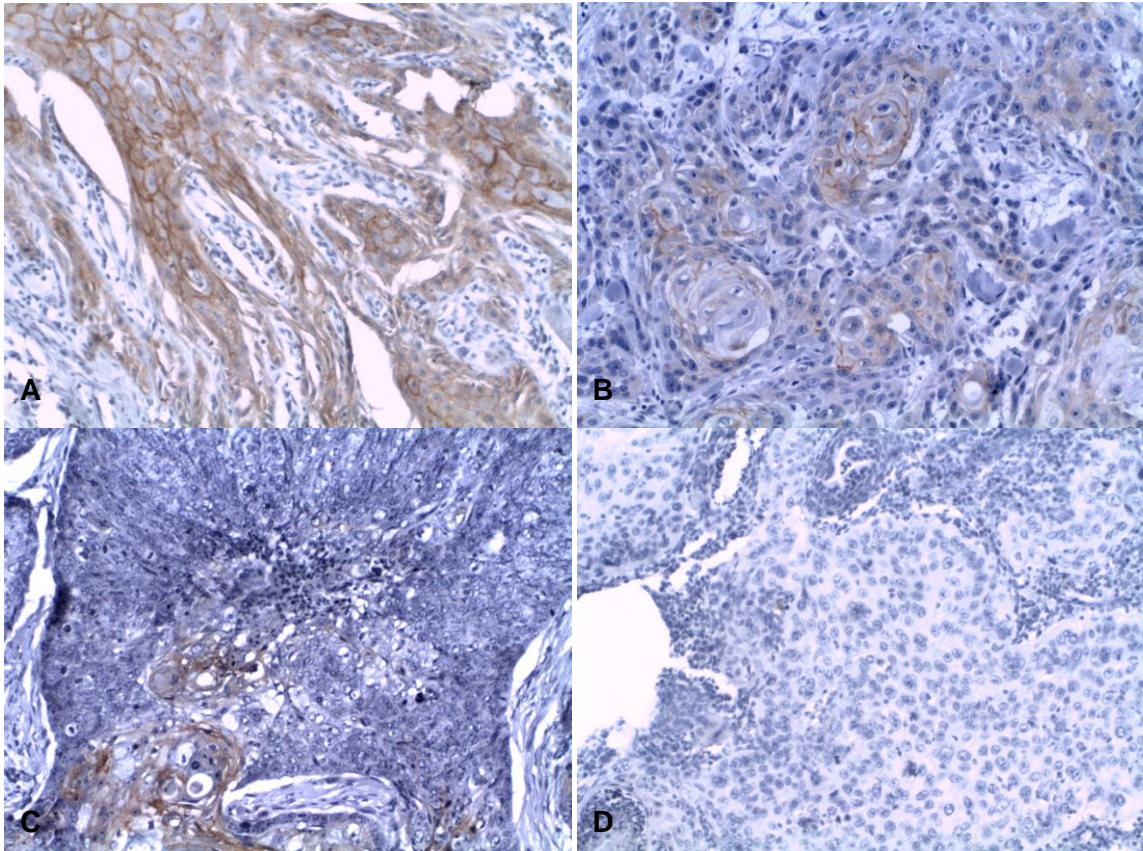


Figura 6. Expressão imuno-histoquímica da E-cad nas amostras de CCE. A: positividade de E-cad preservada em áreas bem diferenciadas da neoplasia. IHQ 100x. B: positividade preservada de E-cad em área bem diferenciada do carcinoma, em contraste com ausência de marcação em área pouco diferenciada do tumor, na mesma amostra. IHQ 100x. C: expressão de E-cad em células individuais de área pouco diferenciada do carcinoma. IHQ 100x. D: ausência de expressão de E-cad em área pouco diferenciada de CCE. IHQ 100x.

5 DISCUSSÃO

A HPE é uma condição benigna, associada a uma grande variedade de doenças distintas. Seus aspectos clínicos e histopatológicos podem apresentar semelhanças com o CCE bem diferenciado, que dificultam a distinção entre essas duas entidades, principalmente quando o processo subjacente a HPE não é claramente evidente. Essa dúvida diagnóstica é um dilema para o patologista e pode ter grandes implicações no seguimento dos pacientes, pois pode resultar em erro diagnóstico e conduta médica inadequada.

Sendo assim, a identificação de métodos diagnósticos alternativos e complementares à microscopia óptica torna-se necessária. Neste presente estudo, foi avaliada a expressão imuno-histoquímica de marcadores frequentemente ligados à invasão neoplásica, L5, p16 e E-cad, em amostras de pele com diagnóstico de HPE, CA/Cis e CCE invasor.

Apesar de não constar nos objetivos desse estudo, alguns dados clínicos relevantes dos pacientes foram obtidos, tais como gênero, idade, localização das lesões e doenças associadas.

O gênero masculino foi preferencialmente acometido nas amostras de HPE e de CCE. Esse resultado está de acordo com os dados da literatura (41, 103-105).

Quanto às lesões precursoras, sabe-se que a CA ocorre mais em homens do que em mulheres, enquanto que o Cis/Doença de Bowen (DB) tem igual distribuição entre os gêneros (103). Nossos dados revelaram uma distribuição das lesões pré-malignas de 50% para homens e mulheres, sugerindo, portanto, uma característica epidemiológica mais próxima da DB.

Quanto à idade e localização das lesões, os pacientes com CA/Cis e CCE, no nosso estudo, apresentaram uma média de idade mais avançada (63 e 69 anos, respectivamente) e um maior acometimento de áreas expostas ao sol, como face e membros inferiores. Esses dados enfatizam o papel da RUV como principal agente na carcinogênese do CCE de pele, através de anos de danos cumulativos (103).

Já na amostra de HPE, a média de idade foi menor (41 anos) e a localização acometida mais frequentemente foram os membros inferiores. Esses dados estão em concordância com a literatura, tanto para a leishmaniose cutânea, quanto para cromoblastomicose (41, 104, 105). Eles evidenciam a suscetibilidade de uma

população mais jovem a essas doenças, geralmente constituída por trabalhadores rurais, cujo contato com esses micro-organismos ocorre através da sua atividade laboral, em áreas do corpo expostas. No caso da leishmaniose, pela picada do vetor transmissor.

O desenvolvimento da carcinogênese é, sem dúvida, multifatorial. Nossos resultados mostraram que de 3 pacientes com CCE, 2 deles eram albinos, condição genética associada à alteração na síntese de melanina (103) e maior predisposição ao desenvolvimento de tumores cutâneos, dentre eles o CCE. O outro paciente apresentava epidermodisplasia verruciforme, condição associada ao papiloma vírus humano (PVH) e a anomalias na imunidade celular (1), favorecendo, portanto, o desenvolvimento de CCE.

Dois outros pacientes com neoplasia invasora apresentaram história de queimadura prévia e mordida de rato no local de desenvolvimento do carcinoma. Sabe-se, como já citado anteriormente, que lesões por queimaduras graves e úlceras crônicas são fatores relativamente raros (38, 39), distintos do dano solar, que predispõem a aproximadamente 2% dos CCEs (34).

Não houve relato, nos dados de prontuário, de desenvolvimento posterior de CCE nas amostras de HPE e todas as lesões hiperplásicas regrediram após tratamento. Dentre a *CA/Cis*, apenas um caso mostrou recidiva, com desenvolvimento subsequente de CCE. Não houve acometimento linfonodal nem metastático posterior no seguimento das lesões precursoras.

Com relação aos marcadores de invasão, há estudos que evidenciaram, em amostras de CCE, a associação da expressão de L5 com outras moléculas relacionadas à degradação da matriz extracelular no processo de invasão tumoral, tais quais o receptor da UAP (68) e as MP (72). Eles acreditam que a L5 esteja intimamente envolvida na cascata de eventos que leva à invasão das células neoplásicas no estroma subjacente.

O presente estudo comparou a expressão da L5 em lesões com HPE, *CA/Cis* e CCE.

Não foi evidenciada expressão da L5 no epitélio adjacente às lesões nem na MB das amostras examinadas. É possível que a sensibilidade do método imunohistoquímico, utilizado nesta análise, não seja adequada para detectar a L5 associada a essas localizações, uma vez que as células da camada basal

expressam níveis muito baixos dessa proteína, suficientes apenas para a manutenção dessa estrutura de ancoragem (65).

Na literatura, observa-se uma variedade de métodos utilizados para a identificação da expressão L5, com acurácias distintas, tais quais a imunohistoquímica convencional e a hibridização *in situ*. As amostras utilizadas também são heterogêneas, podendo ser de tecidos fixados em formol, ou tecido a fresco congelado, ou ainda serem provenientes de cultura de queratinócitos, por exemplo. Dessa forma, há uma discrepância quanto à marcação da MB pela L5, encontrando-se descrições similares aos nossos resultados ou até mesmo discordantes (59, 65-68, 70-72, 75).

Nesta pesquisa, a maioria das amostras com HPE expressou a L5 (84,21%). A positividade encontrada foi focal, predominante nas células da periferia dos cones interpapilares alongados e em ninhos isolados de células escamosas na derme. A forte marcação da L5 nos queratinócitos migratórios, adjacentes às áreas ulceradas, sugere que essa proteína tenha um papel regulador na migração de células epiteliais nas feridas em cicatrização (65, 67, 79).

Pyke et al. (67) analisaram a hibridização *in situ* de L5 em amostras de feridas de pele de camundongos, decorrentes de condições não malignas, cujas células epiteliais mostraram um fenótipo invasivo transitório. Eles evidenciaram uma expressão fraca de L5 em queratinócitos do fundo das lesões mais recentes (12 horas) e da camada basal da região hiperplásica das lesões mais antigas (1 a 5 dias). Propuseram, portanto, que a expressão do gene dessa proteína parece ser uma condição primária de células de estruturas epiteliais neoformadas, nas quais a proliferação celular esteja ancorada em uma nova MB.

Contudo, Natajara et al. (65) observaram, em culturas de queratinócitos normais, que a expressão da L5 está também associada à migração fisiológica de queratinócitos em envelhecimento. Dessa forma, não é possível afirmar que a produção de L5 promova invasão celular. A sua síntese estaria mais associada a um aumento da motilidade direcionada, seja na migração celular para as camadas mais superficiais do epitélio durante o envelhecimento fisiológico dos queratinócitos, seja para reparar um dano ao epitélio, como o preenchimento de uma úlcera no processo de cicatrização.

Em outro estudo, Kainulainen et al. (66) sugerem que as células epiteliais da mucosa oral aumentam a síntese da L5 em condições patológicas, sejam elas de

natureza inflamatória ou neoplásica, diferindo entre as lesões na quantidade de proteína expressa, com níveis quantitativos crescentes nas lesões de líquen plano, displasias epiteliais e CCE.

Sendo assim, a expressão da L5 nas nossas amostras de HPE, processo de natureza inflamatória e não considerado lesão pré-maligna, sugere que essa glicoproteína não é específica para células tumorais e que sua expressão não deve ser usada como critério de malignidade na avaliação das proliferações epiteliais cutâneas.

A positividade citoplasmática da L5 tem sido observada em algumas amostras de neoplasia intraepitelial (65, 66, 69-73, 75). Em lesões de colo uterino, Skyldberg et al. (69) encontrou 11 casos de Neoplasia intraepitelial grau 3 (NIC 3) com positividade para L5 e relatou que em algumas dessas amostras a expressão dessa proteína estaria associada a áreas de feridas em cicatrização. Noel et al. (74) encontrou expressão da L5 em apenas 34% dos casos de lesão intraepitelial escamosa de alto grau (LIEAG) não associadas a componente invasivo do colo uterino, enquanto que todas as LIEAG (100%) associadas a carcinoma invasor foram positivas.

Nossos dados apresentaram 6 dos 16 casos (37%) de lesões pré-malignas, *CA/Cis*, com algum tipo de positividade, ora focal, em células da interface com a derme, ora difusa e fraca. Dois desses casos exibiram ulceração. Contudo, a expressão dessa proteína não se mostrou mais intensa nas áreas de úlcera. Nas áreas de lesões pré-malignas associadas ao CCE, não houve expressão de L5.

Em estudos de lesões displásicas do trato anogenital baixo (69-71, 73), a positividade imuno-histoquímica da L5 em algumas amostras de neoplasias intraepiteliais, em especial as de alto grau, parece estar associada com o desenvolvimento subsequente de carcinoma no seguimento clínico desses pacientes. É possível que essa proteína seja sintetizada em células neoplásicas de regiões que imediatamente precedam o processo de invasão neoplásica inicial da derme (65), auxiliando assim na detecção de lesões pré-neoplásicas com alto risco para desenvolvimento de carcinoma (69, 70, 73).

Contudo, nossos dados não permitem fazer tal associação, pois apenas um dos casos de *CA/Cis*, com positividade focal para a L5 apresentou, no seguimento, recidiva local com subsequente desenvolvimento de CCE

Todas as amostras de CCE invasor expressaram L5. Nos CCE microinvasores, foi observada uma forte concentração citoplasmática dessa proteína nas células da frente de invasão da neoplasia, concordando com a descrição encontrada na literatura para a expressão da L5 nos carcinomas (66-70, 72-74).

Nos CCE francamente invasores, as áreas bem diferenciadas tiveram expressão fortemente positiva para L5 nas células da periferia tumoral e as áreas menos diferenciadas exibiram positividade difusa. Dos 4 casos com comprometimento linfonodal, 3 eram de amostras com padrão de marcação difusa, e dos 5 casos com relatos de metástase, 4 eram de amostras também com padrão de marcação difusa.

Dados semelhantes foram encontrados por Kuratomi et al. (76) em amostras de CCE de língua, classificando a expressão da L5 em padrões periférico e difuso. Eles observaram que pacientes com o padrão difuso de expressão tiveram um prognóstico pior do que os pacientes com o padrão periférico de marcação. Uma explicação para isso seria que, nas áreas mais bem diferenciadas, as células do centro dos ninhos tumorais preservariam a adesão celular, enquanto que as células da periferia desses grupamentos promoveriam o crescimento expansivo da neoplasia, gerando uma expressão periférica da L5. Por outro lado, nas áreas menos diferenciadas, haveria uma acentuada diminuição da adesão celular, com uma invasão estromal mais agressiva, gerando uma expressão difusa da L5.

Hamasaki et al. (77) analisaram a expressão de L5 em casos de CCE de pele e de DB. Nos CCE, a positividade dessa proteína também foi classificada em periférica e difusa. Contudo, em associação, foi utilizado um sistema de escores para graduar a intensidade da reação imuno-histoquímica e não foi feita a diferenciação entre áreas bem e pouco diferenciadas. Não foram observadas diferenças significativas nos prognósticos dos CCE. Nos casos de DB, a expressão da L5 foi evidenciada numa pequena amostra dos casos (16%).

Margulis et al. (106) também evidenciaram um padrão difuso de expressão de L5 em CCE de alto grau.

Esses achados são diferentes dos encontrados por Natarajan et al. (65), nos quais as células neoplásicas da interface epitélio-estroma de CCE profundamente invasivos, de diferentes localizações (pele, esôfago, colo uterino e mucosa oral), não expressam L5.

Stoltzfus et al. (73) também não evidenciaram a expressão da L5 em um dos casos de CCE pouco diferenciado (pequenas células não queratinizado) de colo uterino analisado.

Malina et al. (72) encontraram expressão semelhante entre os CCE queratinizados e não queratinizados do colo uterino, com positividade forte e intracitoplasmática nas células localizadas na interface estroma/câncer e nas células tumorais invadindo o estroma, independente da profundidade das lesões. Resultados similares foram encontrados por Nilsson et al. (75), em amostras de CCE anal.

Dessa forma, comparando-se os resultados encontrados neste presente estudo com os dados da literatura previamente discutidos, torna-se claro que o papel da expressão imuno-histoquímica da L5 nos carcinomas, com ênfase especial para os CCE, ainda não é completamente compreendido, necessitando de mais pesquisas acerca desse assunto para que haja um profundo entendimento da relação entre a L5 e a invasão tumoral.

Uma possível linha de investigação é a identificação das possíveis rotas de sinalização molecular que levam a superexpressão da L5 nos CCE (78, 79) e a busca por novos marcadores que melhor evidenciem as alterações neoplásicas pré-invasivas durante a progressão do carcinoma.

Alguns trabalhos propõem que, tanto nas displasias severas/carcinomas microinvasivos quanto em queratinócitos normais, localizados na frente de migração celular das feridas em reparo, haja uma resposta comum dos queratinócitos a essas condições patológicas no que se refere à expressão da L5 (65, 79).

Em concordância a isso, nossos achados mostram que o padrão de expressão da L5 foi similar nas amostras examinadas de HPE, CA/Cis, CCE microinvasor e áreas bem diferenciadas de CCE invasor. Logo, sugerimos que a L5 não é um marcador útil para auxiliar na distinção entre essas lesões, não contribuindo, portanto, para auxiliar o patologista nesse dilema diagnóstico.

Com relação a p16, ela tem como função se ligar a quinases dependentes de ciclina-D, preservando a função da pRB, retendo assim o ciclo celular na fase G1 (80). Quando há falha em algum ponto desse processo, como, por exemplo, a expressão inadequada ou incorreta da p16, a divisão celular prossegue, podendo haver a propagação de células geneticamente defeituosas (107).

Na carcinogênese do CCE, especialmente aqueles induzidos por RUV, ainda não se sabe ao certo qual o papel dessa proteína na progressão tumoral, ou seja, no avanço das lesões pré-malignas até o carcinoma invasor.

Quanto à expressão de p16 nas amostras de HPE deste presente trabalho, apenas 2 casos mostraram positividade para essa proteína. Em ambos, a localização foi em membro inferior, área com menor grau de exposição ao sol, em pacientes do gênero masculino, na 5^o década de vida. As duas amostras apresentaram um padrão difuso, com forte intensidade de marcação para essa proteína e expressão de L5 apenas focal.

É possível que essa expressão de p16 tenha ocorrido por fatores associados à RUV ou por outras causas, tal como a infecção por PVH.

Os demais casos de HPE foram negativos para p16. Houve regressão das lesões no seguimento de todos os pacientes avaliados.

Natajaran et al. (65) não evidenciaram expressão imuno-histoquímica de p16 em lesões hiperplásicas benignas de pele e mucosa oral. Contudo, observaram que, em cultura de queratinócitos em envelhecimento e de fundo de feridas, houve aumento da expressão de p16 e de L5, ambos associados com o aumento da motilidade direcionada, já previamente citada neste presente trabalho.

Já Zhu et al. (108), em modelo animal, não evidenciaram expressão de p16 em feridas em cicatrização.

Impola et al. (63), encontraram marcação para p16 em 50% dos casos de úlcera crônica investigados, com positividade em queratinócitos do fundo dessas lesões ou da camada basal de áreas com acantose. Dessa forma, eles sugerem que a perda de p16 nas feridas crônicas seja um marcador de carcinogênese. Contudo, eles não descrevem se houve ou não o desenvolvimento subsequente de CCE no seguimento desses pacientes.

Em suma, há escassos trabalhos na literatura, com resultados divergentes sobre esse assunto, sendo necessários mais estudos sobre a expressão de p16 nas HPE de pele.

Nossos resultados mostraram que, dentre as lesões precursoras, CA/Cis, e os CCE, 75% e 57,14% dos casos, respectivamente, tiveram expressão imuno-histoquímica positiva para p16. Observou-se uma diferença expressiva no que diz respeito ao padrão de positividade, pois, nas lesões pré-malignas, 50% da amostra obteve marcação forte e difusa, enquanto que apenas 7,14% dos CCE

apresentaram marcação semelhante. Além disso, foram observados 42,85% casos de CCE e 31,25% casos de CA/Cis com positividade focal e fraca para p16 em pele adjacente com alterações actínicas.

Nossos achados estão de acordo com outros estudos (107, 109-112), que também evidenciaram positividade de p16 nas lesões pré-malignas de pele, CA e Cis.

Contudo, alguns trabalhos não mostraram positividade para p16 em CA (113) ou em CA não-bowenoide (114).

No nosso trabalho, optamos por agrupar as amostras de CA e de Cis na mesma classificação, a de lesões precursoras de CCE. Escolhemos, para isso, casos de CA liquenoide, hipertrófica e bowenoide, pois os mesmos são diagnósticos diferenciais para DB e para CCE microinvasivos.

Apesar da CA, por si só, ser uma lesão precursora de CCE, o fato de agruparmos essas duas entidades pode ter gerado algum viés nos nossos resultados, pois não se sabe ao certo se ambas as lesões levam ao desenvolvimento de CCE pela mesma via de carcinogênese (107).

Quanto à expressão de p16 nos CCE de pele, a literatura exhibe resultados discrepantes.

Hodges e Smoller (107) encontraram, nos CCE de pele, uma marcação de p16 em 100% dos casos, com intensidade forte, no componente invasivo. Eles sugerem que o aumento da expressão da p16 está relacionado com a progressão tumoral. Outros estudos também evidenciaram superexpressão dessa proteína em CCE invasores (85, 91), enfatizando assim o provável papel fisiopatológico do p16 na via de carcinogênese do CCE de pele, em especial aqueles localizados em áreas expostas ao sol (85).

Nilsson et al. (110) também observaram expressão dessa proteína nos CCE, com um padrão de positividade na periferia dos ninhos de invasão, em áreas bem diferenciadas do tumor, e outro padrão difuso, em áreas menos diferenciadas do carcinoma. Esses achados são similares aos de outro trabalho previamente citado (63). Além disso, seus resultados sugerem que, independente do *status* da pRB (funcionante ou não), o aumento da expressão da p16 está envolvido no processo de infiltração neoplásica, discordando de outros estudos (87, 89, 112).

Já outros autores não encontraram positividade significativa para p16 nos CCE invasores cutâneos. Acreditam, portanto, que a progressão de CA para CCE pode envolver a inativação dessa proteína (65, 84, 88, 90, 109).

Natajara et al. (79) observaram que a perda de p16, em células pré-malignas, em resposta a um precursor da L5, favoreceu o crescimento desordenado e invasivo dos CCE.

Nossos resultados para as amostras de CCE foram heterogêneos, não apresentando um padrão específico de marcação de p16 nos carcinomas. Além disso, não observamos correspondência da expressão de p16 com o grau de diferenciação celular nos tumores invasivos.

Em relação à marcação de p16 e o comprometimento linfonodal e metastático, os achados na literatura são exíguos. Chang et al. (114) encontrou correlação significativa entre a perda de expressão do gene da p16 com o aparecimento de metástase em tumores malignos de pele.

Diferentemente de outras pesquisas (65, 79), nossos resultados não evidenciaram expressão imuno-histoquímica similar para o p16 e a L5 em nenhuma das lesões estudadas. Também não evidenciamos concentração da expressão de p16 na frente de invasão neoplásica dos casos de CCE microinvasores nem nas células migratórias das HPE, contradizendo os resultados de outros autores (65).

A superexpressão de p16 tem sido associada à ação do PVH nas lesões intraepiteliais e CCE de colo uterino (112). Esse vírus atuaria na inativação da pRB (110-113). Para as lesões precursoras de CCE de pele, em especial a DB (111, 112), essa associação tem sido evidenciada em alguns casos. Contudo, não há homogeneidade nos resultados encontrados (115).

É importante enfatizar que as lesões precursoras e o CCE têm origem multifatorial, podendo até mesmo existir um sinergismo entre os agentes causais, tais quais o PVH e a RUV (115), por exemplo. Isso explicaria a heterogeneidade descrita acima para a positividade de p16 nessas lesões e a presença dessa proteína distribuída difusamente em um dos nossos casos de CCE, cujo paciente apresentou história prévia de epidermodisplasia verruciforme (1).

Também não se tem um consenso sobre qual o momento exato em que ocorreria a mutação do gene INK4a na progressão tumoral, sendo encontrados resultados que sugerem o acometimento desse gene desde as fases iniciais da displasia (116) ou que evidenciam a sua integridade nas CA de baixo grau (117).

A expressão forte e difusa de p16, predominante nos nossos casos de CA/Cis, pode representar a expressão de p16 anormal, produto de um gene mutante. Sendo assim, as células das lesões precursoras seriam resistentes à apoptose, acumulando, dessa forma, diversas mutações. Dentre essas alterações genéticas, algumas delas poderiam promover a inativação ou deleção do gene INK4a, levando, portanto, a ausência da expressão de p16 em uma subpopulação dos casos que progrediriam para o CCE. Isso explicaria a heterogeneidade de expressão de p16 na nossa amostra de CCE.

Tendo-se em mente a diversidade de resultados encontrados na literatura para as lesões pré-malignas e malignas, estudos posteriores são necessários, considerando a análise de outros parâmetros, tais quais a expressão de PVH, da pRB, as alterações do gene INK4a ou até mesmo o estudo de outros marcadores e genes que participam de outras possíveis vias moleculares de progressão tumoral.

Apesar da expressão de p16 ter sido significativamente diferente entre as amostras de HPE e CCE, nossos resultados sugerem que a análise imunohistoquímica dessa expressão seria um teste pouco sensível para diferenciar HPE de CCE invasivo e, portanto, não seria um bom método para ser aplicado na rotina diagnóstica. Estudos com um maior número de amostras fazem-se necessários para uma melhor caracterização da expressão de p16.

Com relação à E-cad, ela é uma glicoproteína localizada na superfície celular e uma das responsáveis pela adesão entre as células epiteliais (93, 94). Ela está presente em todas as camadas da epiderme e nos anexos cutâneos, na superfície dos queratinócitos (92).

No nosso trabalho, 77,77% dos casos de HPE apresentaram perda parcial de expressão de E-cad. Diferentemente dos nossos achados, em outros estudos, em amostras de HPE de cabeça e pescoço, foi encontrada preservação da E-cad, mesmo nas projeções mais profundas do epitélio no córion adjacente (44, 64).

Uma das possíveis explicações para o nosso resultado é que a diminuição da expressão de E-cad seja um fenômeno natural, que ocorre no processo de cicatrização de feridas, uma vez que a desorganização da arquitetura epitelial leva à necessidade de remodelamento do tecido (118). Vale ressaltar que todos os nossos casos de HPE apresentaram história clínica de ulceração.

Estudos em modelos animais (108, 119) mostraram a redução da E-cad na camada basal e a sua preservação nas camadas mais superficiais da margem de

feridas em cicatrização. Esses resultados sugerem a importância da regulação da expressão da E-cad no epitélio migratório para que ocorra a cicatrização das feridas.

Acredita-se que a perda da expressão de E-cad está associada com o rompimento da adesão intercelular nas células cancerígenas e, conseqüentemente, com o processo de invasão e metástase tumoral (92, 94).

Navarro et al. (120), analisando o CCE em diferentes linhagens de camundongos, observaram uma correlação entre a quantidade de E-cad e a diferenciação tumoral, ou seja, quanto menos diferenciado o tumor, menor ou até mesmo ausente seria a expressão dessa proteína. Além disso, evidenciaram que a introdução de E-cad exógena ou a reativação do gene da E-cad endógena levaram a supressão parcial da tumorigenicidade da linhagem com alto grau de malignidade, dado similar ao relatado em outros trabalhos em material proveniente de seres humanos (92, 121). Sendo assim, eles sugerem que a E-cad tem um papel importante na progressão maligna dos tumores de pele em camundongos.

Obtivemos resultados concordantes com a literatura (44, 64, 94, 95, 96, 121, 122), no que diz respeito à perda da expressão da E-cad nos CCE de pele em humanos, em 100% das nossas amostras de carcinoma invasor. Contudo, não observamos perda completa dessa proteína, como relatado em outros estudos (94, 95, 118).

Papadavid et al. (102) associaram essa expressão anormal de E-cad (perda parcial ou total da expressão) com áreas de carcinoma exibindo alto índice mitótico. Entretanto, não evidenciaram correlação entre a perda da expressão dessa glicoproteína com o grau de diferenciação tumoral.

Já nossos achados mostraram que o padrão de expressão da E-cad parece estar associado com a diferenciação tumoral, pois houve preservação ou marcação mais fraca em grupos de células, nas áreas bem diferenciadas da neoplasia, e ausência de expressão ou expressão focal em células isoladas, nas áreas pouco diferenciadas do carcinoma. Esses dados são similares aos encontrados em modelo animal (120) e em outros estudos com material proveniente de seres humanos (96, 121).

Margulis et al. (106, 121) acreditam que a supressão da expressão de E-cad e a perda da sua função modificam a progressão do CCE, ativando um fenótipo tumoral agressivo e altamente invasivo. Além de estarem associadas com a ativação da degradação da MB pelo aumento da expressão de MP-2 e MP-9 (121) e da

alteração de outras proteínas envolvidas com a adesão célula-célula e célula-matriz (106).

Nos casos de lesões pré-malignas, nossos resultados mostraram perda parcial da E-cad em 93,75% dos casos. Não houve perda completa em nenhuma amostra dessas lesões. Na pele adjacente a CA/Cis, houve preservação da expressão dessa proteína. Foi encontrada também, em duas amostras de CCE, expressão anormal de E-cad em áreas de CA na pele adjacente.

Há discordância na literatura a respeito da expressão de E-cad nas lesões pré-malignas, mas achados semelhantes aos nossos foram observados em outro trabalho (102).

Furukawa et al. (92) afirmam que a avaliação imuno-histoquímica de queratinócitos em CA mostra uma expressão instável de caderinas.

Papadavid et al. (102) sugerem que a probabilidade de expressão anormal da E-cad aumente de acordo com a progressão das lesões, sendo menor nas lesões benignas e aumentando nas pré-malignas, CA/Cis, e, principalmente, nos CCE. Acreditam que essa proteína possa ser um indicador precoce do processo neoplásico.

Outros investigadores (122) propõem ainda que as alterações no gene da E-cad podem representar um importante mecanismo de inativação dessa proteína em lesões pré-malignas e malignas da pele. Eles constataram também que essas alterações genéticas aumentam com o avançar da progressão tumoral, sendo mais numerosas nos CCE.

Brouxhon et al. (118) mostraram, em modelo animal, a perda de expressão de E-cad em queratinócitos após exposição à RUV. Além disso, pela análise dos seus resultados, eles sugerem que a RUV possa iniciar a tumorigênese em queratinócitos pela diminuição da regulação da adesão celular mediada por E-cad, através de mecanismos de degradação dessa proteína. Eles propõem que exista a perda sequencial de E-cad à medida que há a progressão da displasia para o CCE.

Em contrapartida, outros autores (94, 96) evidenciaram nas lesões pré-malignas, DB e CA, positividade de E-cad similar a da epiderme normal.

Em resumo, os achados na literatura são conflitantes a respeito da expressão da E-cad nas lesões pré-malignas de pele, sendo necessários maiores estudos acerca desse assunto, uma vez que a detecção da expressão dessa proteína pode estar associada com a técnica utilizada por cada trabalho. Assim, esses resultados

em que houve preservação da E-cad nas CA/Cis podem não expressar com precisão o fenótipo do gene produtor dessa proteína.

Koseki et al. (95) utilizaram um método de fixação de tecidos diferente da formalina, contendo acetona, metilbenzoato e xilol. Atribuem a ele uma preservação de antigenicidade semelhante à observada em tecidos a fresco congelados. Eles observaram que houve um decréscimo da E-cad em 18,2% dos CCE, proporção bem menor do que a vista na literatura, e a preservação desse marcador na DB.

Levando-se em conta esses achados, uma parcela da perda de expressão de E-cad em praticamente todas as amostras analisadas no nosso estudo poderia ser decorrente da sensibilidade da E-cad ao tempo de fixação em formalina, uma vez que foram utilizados casos com mais de 10 anos de arquivamento, não sendo possível determinar precisamente o tempo que as amostras ficaram no formol antes de serem incluídas em parafina.

Considerando-se os dados da literatura aqui apresentados, acreditamos que a desorganização tecidual mediada pela E-cad é sem dúvida um fator crítico para a promoção e disseminação do CCE. Contudo, a diminuição ou ausência de sua expressão imuno-histoquímica em lesões benignas, tais quais, as doenças bolhosas autoimunes (92), as dermatites espongíóticas (122) e os nossos casos de HPE, faz com que acreditemos que ela é apenas um dos fatores que participam da carcinogênese. E que, para o desenvolvimento e progressão tumoral, são necessários outros elementos, pois apenas a perda da expressão da E-cad não é suficiente.

Apesar da expressão de Ecad ter sido significativamente diferente entre as amostras de HPE e CCE, nossos resultados sugerem que a análise da expressão seria um teste pouco específico para diferenciar HPE de CCE invasivo e, portanto, não seria um bom teste para ser aplicado na rotina. Estudos com um maior número de amostras fazem-se necessários para uma melhor caracterização da expressão de Ecad.

6. CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo demonstraram que a frequência e o padrão de expressão da L5 foram similares nas amostras examinadas de HPE, CA/Cis, CCE microinvasor e áreas bem diferenciadas de CCE invasor. Logo, sugerimos que a L5 não seria um marcador útil para auxiliar na distinção entre essas lesões.

Com relação à expressão de p16 e à perda parcial da expressão da E-cad, apesar de terem sido significativamente mais frequentes nas amostras de CEC, os resultados sugerem, respectivamente, sensibilidade e especificidade baixas para detecção de CEC de pele. Assim sendo, estas moléculas não deveriam ser consideradas marcadores ideais para a distinção entre esta lesão e a HPE na rotina diagnóstica.

Mais estudos com um maior número de amostras fazem-se necessários para uma melhor caracterização da expressão destes marcadores na avaliação das diferenças imuno-histoquímicas entre a HPE e o CCE invasor de pele, com ênfase especial para os CCE microinvasores e CCE bem diferenciados.

Conforme apresentado neste trabalho, os dados da literatura acerca dos marcadores imuno-histoquímicos que auxiliariam na distinção entre a HPE e o CCE são escassos e por vezes conflitantes. Logo, estudos posteriores visando à análise de outros possíveis marcadores na diferenciação entre essas duas entidades também se fazem necessários.

REFERÊNCIAS

- 1 Elder DE, Elenitsas R, Johnson BL, Murphy GF. *Lever's Histopathology of the Skin*. 9th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2005.
- 2 Wick MR, Patterson JW. Selected pseudoneoplastic Lesions of the skin. *Arch Pathol Lab Med*. 2010 Mar; 134(3): 369-377.
- 3 Quintella LP, Cuzzi T, de Fátima Madeira M, Valete-Rosalino CM, de Matos Salgueiro M, de Camargo Ferreira e Vasconcellos E, et al. Cutaneous leishmaniasis with pseudoepitheliomatous hyperplasia simulating squamous cell carcinoma [letter]. *Am J Dermatopathol*. 2011 Aug; 33(6): 642-644.
- 4 Lynch JM. Understanding pseudoepitheliomatous hyperplasia. *Pathology Case Reviews*. 2004 Mar/Apr; 9(2): 36-45.
- 5 El-Khoury J, Kibbi AG, Abbas O. Mucocutaneous pseudoepitheliomatous hyperplasia: a review. *Am J Dermatopathol*. 2012 Apr; 34(2): 165-175.
- 6 Grunwald MH, Lee JYY, Ackerman AB. Pseudocarcinomatous hyperplasia. *Am J Dermatopathol*. 1988 Apr; 10(2): 95-103.
- 7 Ju DMC. Pseudoepitheliomatous hyperplasia of the skin. *Dermatol Int*. 1967 Apr/Jun; 6(2): 82-92.
- 8 Ackerman, AB. *Differential Diagnosis in Dermatopathology I, II, III, IV*. 3rd ed. Ardor Scribendi; 2001.
- 9 Zayour M, Lazova R. Pseudoepitheliomatous hyperplasia: a review. *Am J Dermatopathol*. 2011 Apr; 33(2): 112-126.
- 10 Goel R, Wallace ML. Pseudoepitheliomatous hyperplasia secondary to cutaneous aspergillus. *Am J Dermatopathol*. 2001 Jun; 23(3): 224-226.
- 11 Kaminagakura E, Bonan PR, Lopes MA, Almeida OP. Cell proliferation and p53 expression in pseudoepitheliomatous hyperplasia of oral paracoccidioidomycosis. *Mycoses*. 2006 Sep; 49(5): 393-396.
- 12 Motswaledi HM, Monyemangene FM, Maloba BR, Nmutavhanani DL. Blastomycosis: a case report and review of the literature. *Int J Dermatol*. 2012 Sep; 51(9): 1090-1093.
- 13 Fu X, Jiang D, Chen W, Sun T, Sheng Z. Pseudoepitheliomatous hyperplasia formation after skin injury. *Wound Repair Regen*. 2007 Jan/Feb; 15(1): 39-46.

- 14 Warter A, Walter P, Meyer C, Barrière P, Galatir L, Wilk A. Mandibular pseudocarcinomatous hyperplasia. *Histopathology*. 2000 Aug; 37(2): 115-117.
- 15 Cruickshank AH, Mcconnell EM, Miller DG. Malignancy is scars, chronic ulcers and sinuses. *J Clin Pathol*. 1963 Nov; 16: 573-580.
- 16 Akilov OE, Donovan MJ, Stepinac T, Carter CR, Whitcomb JP, Hasan T, et al. T helper type 1 cytokines and keratinocyte growth factor play a critical role in pseudoepitheliomatous hyperplasia initiation during cutaneous leishmaniasis. *Arch Dermatol Res*. 2007 Sep; 299(7): 315-325.
- 17 Zayour M, Gilmore E, Heald P, Rose M, Poligone B, Lazova R. A distinct entity in the spectrum of the CD30+cutaneous lymphoproliferative diseases: oligoclonal nodules with pseudoepitheliomatous hyperplasia followed by spontaneous resolution. *Am J Dermatopathol*. 2009 Feb; 31(1): 37-43.
- 18 Scarisbrick JJ, Calonge E, Orchard G, Child FJ, Russel-Jones R. Pseudocarcinomatous change in lymphomatoid papulosis and primary cutaneous CD30+ lymphoma: a clinicopathologic and immunohistochemical study of 6 patients. *J Am Acad Dermatol*. 2001 Feb; 44(2): 239-247.
- 19 Tuttle MS, Rosenberg AS, Winfield HL, Somach SC. Basal cell carcinoma associated pseudocarcinomatous hyperplasia [letter]. *Am J Dermatopathol*. 2011 Feb; 33(1): 107.
- 20 Hanly AJ, Jorda M, Elgart GW. Cutaneous malignant melanoma associated with extensive pseudoepitheliomatous hyperplasia. Report of a case and discussion of the origin of pseudoepitheliomatous hyperplasia. *J Cutan Pathol*. 2000; 27(3): 153-156.
- 21 Barkan GA, Paulino AF. Are epidermal growth factor and transforming growth factor responsible for pseudoepitheliomatous hyperplasia associated with granular cell tumors? *Ann Diagn Pathol*. 2003 Apr; 7(2): 73-77.
- 22 Fernandez-Flores A, Valerdiz S. Pseudoepitheliomatous hyperplasia associated with hidradenoma papiliferum. *Am J Dermatopathol*. 2012 May; 34(3): e31-e36.
- 23 Daldon PEC, Macedo de Souza E, Cintra ML. Hypertrophic lúpus erythematosus: a clinicopathological study of 14 cases. *J Cutan Pathol*. 2003 Aug; 30(7): 443-448.
- 24 Cui W, McGregor DH, Stark SP, Ulusarac O, Mathur SC. Pseudoepitheliomatous hyperplasia – an unusual reaction following tattoo: report of a case and review of the literature. *Int J Dermatol*. 2007 Jul; 46(7): 743-745.
- 25 Chapman MS, Quitadamo MJ, Perry AE. Pigmented squamous cell carcinoma. *J Cutan Pathol*. 2000; 27: 93-95.

- 26 Kluger N. Issues with keratoacanthoma, pseudoepitheliomatous hyperplasia and squamous cell carcinoma within tattoos: a clinical point of view [letter]. *J Cutan Pathol.* 2010 Jul; 37(7): 812-813.
- 27 Mott RT, Rosenberg A, Livingston S, Morgan MB. Melanoma associated with pseudoepitheliomatous hyperplasia: a case series and investigation into the role of epidermal growth factor receptor. *J Cutan Pathol.* 2002 Sep; 29(8): 490-497.
- 28 Freeman RG. On the pathogenesis of pseudoepitheliomatous hyperplasia. *J Cutan Pathol.* 1974; 1(6): 231-237.
- 29 Civatte J. Pseudo-carcinomatous hyperplasia. *J Cutan Pathol.* 1985 Jun/Aug; 12(3-4): 214-223.
- 30 Reis-Filho JS, Gasparetto EL, Schmitt FC, Fillus-Neto J. Pseudoepitheliomatous hyperplasia in cutaneous malignant melanoma: a rare and misleading feature [letter]. *J Cutan Pathol.* 2001 Oct; 28(9): 496-497.
- 31 Ramdial PK, Kharsany AB, Reddy R, Chetty R. Transepithelial elimination of cutaneous vulval granuloma inguinale. *J Cutan Pathol.* 2000 Nov; 27(10): 493-499.
- 32 Fu X, Sun X, Li X, Sheng Z. Dedifferentiation of epidermal cells to stem cells in vivo [letter]. *Lancet.* 2001 Sep; 358(9287): 1067-1068.
- 33 Courville P, Wechsler J, Thomine E, Vergier B, Fonck Y, Souteyrand P, et al. Pseudoepitheliomatous hyperplasia in cutaneous T-cell lymphoma. A clinical, histopathological and immunohistochemical study with particular interest epithelial growth factor expression. *Br J Dermatol.* 1999 Mar; 140(3): 421-426.
- 34 Gattuso P, Candel AG, Castelli MJ, Kowal-Vern A, Gamelli RL, Herman C. Pseudoepitheliomatous hyperplasia in chronic cutaneous wounds. A flow cytometric study. *J Cutan Pathol.* 1994 Aug; 21(4): 312-315.
- 35 White C, Weidman FD. Pseudoepitheliomatous hyperplasia at the margins of cutaneous ulcers. *Jour A M A.* 1927 June; 88(25): 1959-1963.
- 36 Eng AM, Worobec S. Cytologic features of hyperplastic epidermis. *J Cutan Pathol.* 1977 Oct; 4(5): 258-265.
- 37 Johnston WH, Miller TA, Frileck SP. Atypical pseudoepitheliomatous hyperplasia and squamous cell carcinoma in chronic cutaneous sinuses and fistulas. *Plast Reconstr Surg.* 1980 Sep; 66(3): 395-400.
- 38 Tavares E, Dores JA, Martinho G, Ferreira L, Vera-Cruz F, Úlcera de Marjolin associada a ulceração e osteomilite crônicas. *An Bras Dermatol.* 2011 Mar/Apr; 86(2): 366-369.

- 39 Karabekmez FE, Duymaz A, Keskin M, Tosun Z. Squamous cell carcinoma on cutaneous leishmaniasis lesion. *Dermatol Surg.* 2008 Dec; 34(12): 1742-1743.
- 40 Kerr-Valentic MA, Samimi K, Rohlen BH, Agarwal JP, Rockwell WB. Marjolin's ulcer: modern analysis of an patient problem. *Plast Reconstr Surg.* 2009 Jan; 123(1): 184-191.
- 41 Torres E, Beristain JG, Lievanos Z, Arenas R. Chromoblastomycosis associated with a lethal squamous cell carcinoma. *An Bras Dermatol.* 2010 Mar/Apr; 85(2): 267-270.
- 42 Friedman R, Hanson S, Goldberg LH. Squamous cell carcinoma arising in a leishmania scar. *Dermatol Surg.* 2003 Nov; 29(11): 1148-1149.
- 43 Jones RW, Rowan DM, Kirker J, Wilkinson EJ. Vulval lichen planus: progression of pseudoepitheliomatous hyperplasia to invasive vulval carcinomas. *BJOG.* 2001 Jun; 108(6): 665-666.
- 44 Zarovnaya E, Black C. Distinguishing pseudoepitheliomatous hyperplasia from squamous cell carcinoma in mucosal biopsy specimens from the head and neck. *Arch Pathol Lab Med.* 2005 Aug; 129(8): 1032-1036.
- 45 Klieb HBE, Raphael SJ. Comparative study of the expression of p53, ki67, e-cadherin and MMP-1 in verrucous hyperplasia and verrucous carcinoma of the oral cavity. *Head Neck Pathol.* 2007 Dec; 1(2): 118-122.
- 46 Sund M, Kalluri R. Tumor stroma derived biomarkers in cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2009 Jun; 28(1-2): 177-183.
- 47 Chin D, Boyle GM, Kane AJ, Theile DR, Hayward NK, Parson PG, et al. Invasion and metastasis markers in cancers. *Br J Plast Surg.* 2005 Jun; 58(4): 466-474.
- 48 Walsh JE, Lathers DMR, Chi AC, Gillespie MB, Day TA, Youg MRI. Mechanisms of tumor growth and metastasis in head and neck squamous cell carcinoma. *Curr Treat Options Oncol.* 2007 Jun; 8(3): 227-238.
- 49 Utikal J, Schadendorf d, Ugurel S. Serologic and immunohistochemical prognostic biomarkers of cutaneous malignancies. *Arch Dermatol Res.* 2007 Mar; 298(10): 469-477.
- 50 Brown KW, Parkinson EK. Alteration of the extracellular matrix of cultured human keratinocytes by transformation and during differentiation. *Int J Cancer.* 1985 Jun; 35(6): 799-807.

- 51 Okamoto M, Nishimine M, Kishi M, Kirita T, Sugimura M, Nakamura M, et al. Prediction of delayed neck metastasis in patients with stage I/II squamous cell carcinoma of the tongue. *J Oral Pathol Med*. 2002 Apr; 31(4): 227–233.
- 52 Chuang HC, Su CY, Huang HY, Huang CC, Chien CY, Du YY, et al. Active matrix metalloproteinase-7 is associated with invasion in buccal squamous cell carcinoma. *Mod Pathol*. 2008 Dec; 21(12): 1444-1450.
- 53 Chen YJ, Chang JT, L Lee L, Wang HM, Liao CT, Chiu CC, et al. DSG3 is overexpressed in head neck cancer and is a potential molecular target for inhibition of oncogenesis. *Oncogene*. 2007 Jan; 26(3): 467-476.
- 54 Culhaci N, Metin K, Copcu E, Dikicioglu E. Elevated expression of MMP-13 and TIMP-1 in head and neck squamous cell carcinomas may reflect increased tumor invasiveness. *BMC Cancer*. 2004 Aug; 4: 42.
- 55 Chiba T, Kawachi H, Kawano T, Kumagai J, Kitagaki K, Sekine M, et al. Independent histological risk factors for lymph node metastasis of superficial esophageal squamous cell carcinoma; implication of claudin-5 immunohistochemistry for expanding the indications of endoscopic resection. *Dis Esophagus*. 2010 Jul; 23(5): 398-407.
- 56 Mendelsohn AH, Lai CK, Shintaku IP, Fishbein MC, Brugman K, Elashoff DA. Snail as a novel marker for regional metastasis in head and neck squamous cell carcinoma. *Am J Otolaryngol*. 2012 Jan/Feb; 33(1): 6-13.
- 57 Usami Y, Satake S, Nakayama F, Matsumoto M, Ohnuma K, Komori T, et al. Snail-associated epithelial–mesenchymal transition promotes oesophageal squamous cell carcinoma motility and progression. *J Pathol*. 2008 Jul; 215(3): 330-339.
- 58 Sauter ER, Nesbit M, Watson JC, Klein-Szanto A, Litwin S, Herlyn M. Vascular endothelial growth factor is a marker of tumor invasion and metastasis in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Clin Cancer Res*. 1999 Apr; 5(4): 775-782.
- 59 Barsky SH, Siegal GP, Jannotta F, Liotta LA. Loss of basement membrane components by invasive tumors but not by their benign counterparts. *Lab Invest*. 1983 Aug; 49(2): 140-147.
- 60 Beck K, Hunter I, Engel J. Structure and function of laminin: anatomy of a multidomain glycoprotein. *FASEB J*. 1990 Feb; 4(2): 148-160.
- 61 Yurchenco PD, SchittnyJC. Molecular architecture of basement membranes. *FASEB J*. 1990 Apr; 4(6): 1577-1590.

- 62 Colognato H, Yurchenco PD. Form and function: the Laminin family of heterotrimers. *Dev Dyn*. 2000 Jun; 218(2): 213-234.
- 63 Impola U, Jeskanen L, Ravanti L, Syrjänen S, Baldursson B, Kähäri VM, et al. Expression of matrix metalloproteinase (MMP)-7 and MMP-13 and loss of MMP-19 and p16 are associated with malignant progression in chronic wounds. *Br J Dermatol*. 2005 Apr; 152(4): 720-726.
- 64 You TK, Kim KM, Noh SJ, Bae JS, Jang KY, Chung MJ, et al. Expressions of E-cadherin, cortactin and MMP-9 in pseudoepitheliomatous hyperplasia and squamous cell carcinoma of the head and neck: their relationships with clinicopathologic factors and prognostic implication. *Korean J Pathol*. 2012 Aug; 46(4): 331-340.
- 65 Natarajan E, Saeb M, Crum CP, Woo SB, Mckee PH, Rheinwald JG. Co-expression of p16INK4A and laminin 5 γ 2 by microinvasive and superficial squamous cell carcinomas *in vivo* and by migrating wound and senescent keratinocytes in culture. *Am J Pathol*. 2003 Aug; 163(2): 477-491.
- 66 Kainulainen TK, Autio-Harmainen, Oikarinen A, Salo S, Tryggvason K, Salo T. Altered distribution and synthesis of laminin-5 (Kalinin) in oral lichen planus, epithelial dysplasias and squamous cell carcinomas. *Br J Dermatol*. 1997 Mar; 136(3): 331-336.
- 67 Pyke J, Romer J, Kallunki P, Lund LR, Ralfkiaer E, Dano K, et al. The γ 2 chain of Kalinin /laminin 5 is preferentially expressed in invading malignant cells in human cancers. *Am J Pathol*. 1994 Oct; 145(4): 782-791.
- 68 Pyke C, Salo S, Ralfkiaer E, Romer J, Dano K, Tryggvason K. Laminin-5 is a marker of invading cancer cells in some human carcinomas and is coexpressed with the receptor for urokinase plasminogen activator in budding cancer cells in colon adenocarcinomas. *Cancer Res*. 1995 Sept; 55(18): 4132-4139.
- 69 Skyldberg B, Salo S, Eriksson E, Aspenblad U, Moberger B, Tryggvason K, et al. Laminin-5 as a marker of invasiveness in cervical lesions. *J Natl Cancer Inst*. 1999 Nov; 91(21): 1882-1887.
- 70 Nordström B, Einhorn N, Silfverswärd C, Sjövall K, Tryggvason K, Auer G. Laminin-5 γ 2 chain as an invasivity marker for uni and multifocal lesions in the lower anogenital tract. *Int J Gynecol Cancer*. 2002 Jan/Feb; 12(1): 105-109.
- 71 Kohlberger P, Beneder C, Horvat R, Leodolter S, Breitenecker G. Immunohistochemical expression of laminin-5 in cervical intraepithelial neoplasia. *Gynecol Oncol*. 2003 Jun; 89(3): 391-394.

- 72 Malina R, Motoyama S, Hamana S, Maruo T. Laminin-5 γ 2 chain and matrix metalloproteinase-2 expression in the neoplastic changes of uterine cervical squamous epithelium. *Kobe J Med Sci.* 2004; 50(3-4): 123-130.
- 73 Stoltzfus P, Salo S, Eriksson E, Aspenblad U, Tryggvason K, Auer G, et al. Laminin-5 γ 2 chain expression facilitates detection of invasive squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Int J Gynecol Pathol.* 2004 Jul; 23(3): 215-222.
- 74 Noel JC, Fernandez- Aguilar S, Fayt I, Buxant F, Ansion MH, Simon P, et al. Laminin-5 γ 2 chain expression in cervical intraepithelial neoplasia and invasive cervical carcinoma. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2005 Nov; 84(11): 1119-1123.
- 75 Nilsson PJ, Rubio C, Lenander C, Auer G, Glimelius B. Tumour budding detected by Laminin-5 γ 2 chain immunohistochemistry is of prognostic value in epidermoid anal cancer. *Ann Oncol.* 2005 Jun; 16(6): 893-898.
- 76 Kuratomi Y, Kumamoto M, Kidera K, Toh S, Masuda M, Nakashima T, et al. Diffuse expression of laminin γ 2 chain in disseminating and infiltrating cancer cells indicates a highly malignant state in advanced tongue cancer. *Oral Oncol.* 2006 Jan; 42(1): 73-76.
- 77 Hamasaki H, Koga K, Aoki M, Hamasaki M, Koshikawa M, Seiki M, et al. Expression of laminin-5 γ 2 chain in cutaneous squamous cell carcinoma and its role in tumour invasion. *Br J Cancer.* 2011 Sep; 105(6): 824-832.
- 78 Degen M, Natarajan E, Barron P, Widlund HR, Rheinwald JG. MAPK/ERK-dependent translation factor hyperactivation and dysregulated laminin γ 2 expression in oral dysplasia and squamous cell carcinoma. *Am J Pathol.* 2012 Jun; 180(6): 2462-2478.
- 79 Natarajan E, Omobono JD, Jones JC, Rheinwald JG. Co-expression of p16^{INK4A} and laminin-5 by keratinocytes: a wound-healing response coupling hypermotility with growth arrest that awry during epithelial neoplastic progression. *J Invest Dermatol Symp Proc.* 2005 Nov; 10(2): 72-85.
- 80 Sherr CJ. The pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited. *Cancer Res.* 2000 Jul; 60(14): 3689-3695.
- 81 Tyler LN, Ai L, Zuo C, Fan CY, Smoller BR. Analysis of promoter hypermethylation of death associated protein kinase and p16 tumor suppressor genes in actinic keratoses and squamous cell carcinomas of the skin. *Mod Pathol.* 2003 Jul; 16(7): 660-664.

- 82 Krähn G, Leiter U, Udart M, Kaskel P, Peter RU. UVB-induced decrease of p16/CDKN2A expression in skin cancer patients. *Pigment Cell Res.* 2001 Jun; 14(3): 201-205.
- 83 Hussein MR. Ultraviolet radiation and skin cancer: molecular mechanisms. *J Cutan Pathol.* 2005 Mar; 32(3): 191-205.
- 84 Murao K, Kubo Y, Ohtani Y, Hara E, Arase S. Epigenetic abnormalities in cutaneous squamous cell carcinomas: frequent inactivation of the RB1/p16 and p53 pathways. *Br J Dermatol.* 2006 Nov; 155(5): 999-1005.
- 85 Conscience I, Jovenin N, Coissard C, Lorenzato M, Durlach A, Grange F, et al. P16 is overexpressed in cutaneous carcinomas located on sun-exposed areas. *Eur J Dermatol.* 2006 Sept/Oct; 16(5): 518-522.
- 86 Nandakumar V, Vaid M, Tollefsbol TO, Katiyar SK. Aberrant DNA hypermethylation patterns lead to transcriptional silencing of tumor suppressor genes in UVB-exposed skin and UVB-induced skin tumors of mice. *Carcinogenesis.* 2011 Apr; 32(4): 597-604.
- 87 Linardopoulos S, Street AJ, Quelle DE, Parry D, Peters G, Sherr CJ, et al. Deletion and altered regulation of p16^{INK4A} and p15^{INK4B} in undifferentiated mouse skin tumors. *Cancer Res.* 1995 Nov; 55(22): 5168-5172.
- 88 Brown VL, Harwood CA, Crook T, Cronin JG, Kelsell DP, Proby CM. p16^{INK4A} and p14^{ARF} tumor suppressor genes are commonly inactivated in cutaneous squamous cell carcinoma. *J Invest Dermatol.* 2004 May; 122(5): 1284-1292.
- 89 Nilsson K, Landberg G. Subcellular localization, modification and protein complex formation of the cdk-inhibitor p16 in Rb-functional and Rb-inactivated tumor cells. *Int J Cancer.* 2006 Mar; 118(5): 1120-1125.
- 90 Gray SE, Kay E, Leader M, Mabruk M. Analysis of p16 expression and allelic imbalance / loss of heterozygosity of 9p21 in cutaneous squamous cell carcinomas. *J Cell Mol Med.* 2006 Jul/Sep; 10(3): 778-788.
- 91 Eshkour SA, Ismail P, Rahman SA, Mirinargesi M, Oshkour SA. Increased protein expression of p16 and cyclin D1 in squamous cell carcinoma tissues. *Biosci Trends.* 2009 Jun; 3(3): 105-109.
- 92 Furukawa F, Fujii K, Horiguchi Y, Matsuyoshi N, Fujita M, Toda K, et al. Roles of E- and P-cadherin in the human skin. *Microsc Res Tech.* 1997 Aug; 38(4): 343-352.
- 93 Takeichi, M. The cadherins: cell-cell adhesion molecules controlling animal morphogenesis. *Development.* 1988 Apr; 102(4): 639-655.

- 94 Fuller LC, Allen MH, Montesu M, Barker JNW, Macdonald DM. Expression of E-cadherin in human epidermal non-melanoma cutaneous tumours. *Br J Dermatol.* 1996 Jan; 134(1): 28-32.
- 95 Koseki S, Ansai S, Aoki T, Hozumi Y, Mitsuhashi Y, Kondo S. E-cadherin expression in skin tumors using an AMeX immunohistostaining method. *J Dermatol.* 2000 May; 27(5): 307-311.
- 96 Suiqing C, Min Z, Lirong C. Overexpression of phosphorylated-STAT3 correlated with the invasion and metastasis of cutaneous squamous cell carcinoma. *J Dermatol.* 2005 May; 32(5): 354-360.
- 97 Fadare O, Reddy H, Wang J, Hileeto D, Schwartz PE, Zheng W. E-cadherin and β -catenin expression in early stage cervical carcinoma: a tissue microarray study of 147 cases. *World J Surg Oncol.* 2005 Jun; 3:38: 1-11.
- 98 Takeno S, Noguchi T, Fumoto S, Kimura Y, Shibata T, Kawahara K. E-cadherin expression in patients with esophageal squamous cell carcinoma: promoter hypermethylation, snail overexpression, and clinicopathologic implications. *Am J Clin Pathol.* 2004 Jul; 122(1): 78-84.
- 99 Campos RS, Lopes A, Guimarães GC, Carvalho AL, Soares FA. E-cadherin, MMP-2, and MMP-9 as prognostic markers in penile cancer: analysis of 125 patients. *Urology.* 2006 Apr; 67(4): 797-802.
- 100 Kato Y, Hirano T, Yoshida K, Yashima K, Akimoto S, Tsuji K, et al. Frequent loss of E-cadherin and/or catenins in intrabronchial lesions during carcinogenesis of the bronchial epithelium. *Lung Cancer.* 2005 Jun; 48(3): 323-330.
- 101 Pyo SW, Hashimoto M, Kim YS, Kim CH, Lee SH, Johnson KR, et al. Expression of E-cadherin, P-cadherin and N-cadherin in oral squamous cell carcinoma: correlation with the clinicopathologic features patient outcome. *J Craniomaxillofac Surg.* 2007 Jan; 35(1): 1-9.
- 102 Papadavid E, Pignatelli M, Zakynthinos S, Krausz T, Chu AC. Abnormal immunoreactivity of the E-cadherin/catenin (α -, β -, and γ -) complex in premalignant and malignant non-melanocytic skin tumors. *J Pathol.* 2002 Feb; 196(2): 154-162.
- 103 Freedberg IM, Eisen AZ, Wolff K, Austen KF, Goldsmith LA, Katz SI. *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine.* 6th ed. McGraw-Hill; 2003; vol.I.
- 104 de Castro EA, Soccol VT, Membrive N, Luz E. Estudo das características epidemiológicas e clínicas de 332 casos de leishmaniose tegumentar notificados na

região norte do Estado do Paraná de 1993 a 1998. Rev Soc Bras Med Trop. 2002 Sep/Oct; 35(5): 445-452.

105 Name RQ, Borges KT, Nogueira LSC, Sampaio JHD, Tauil PL, Sampaio RNR. Estudo clinico, epidemiologico e terapeutico de 402 pacientes com leishmaniose tegumentar americana atendidos no Hospital Universitario de Brasilia, DF, Brasil. An Bras Dermatol. 2005; 80(3): 249-254.

106 Margulis A, Zhang W, Alt-Holland A, Pawagi S, Prabhu P, Cao J, et al. Loss of intercellular adhesion activates a transition from low-to high-grade human squamous cell carcinoma. Int J Cancer. 2006 Feb 15; 118(4): 821-831.

107 Hodges A, Smoller BR. Immunohistochemical comparison of p16 expression in actinic keratoses and squamous cell carcinomas of the skin. Mod Pathol. 2002 Nov; 15(11): 1121-1125.

108 Kuwahara M, Hatoko M, Tada H, Tanaka A. E-cadherin expression in wound healing of mouse skin. J Cutan Pathol. 2001 Apr; 28(4): 191-199.

109 Mortier L, Marchetti P, Delaporte E, Martin de Lassalle E, Thomas P, Piette F, et al. Progression of actinic keratosis to squamous cell carcinoma of the skin correlates with deletion of the 9p21 region encoding the p16^{INK4a} tumor suppressor. Cancer Lett. 2002 Feb; 176(2): 205-214.

110 Nilsson K, Svensson S, Landberg G. Retinoblastoma protein function and p16^{INK4a} expression in actinic keratosis, squamous cell carcinoma *in situ* and invasive squamous cell carcinoma of the skin and links between p16^{INK4a} expression and infiltrative behavior. Mod Pathol. 2004 Dec; 17(12): 1464-1474.

111 Murao K, Kubo Y, Takiwaki H, Arase S, Matsumoto K. Bowen's disease on the sole: p16^{INK4a} overexpression associated with human papillomavirus type 16. Br J Dermatol. 2005 Jan; 152(1): 170-173.

112 Willman JH, Heinz D, Golitz LE, Shroyer KR. Correlation of p16 and pRb expression with HPV detection in Bowen's disease. J Cutan Pathol. 2006 Sep; 33(9): 629-633.

113 Salama ME, Mahmood MN, Qureshi HS, MA C, Zarbo RJ, Ormsby AH. p16^{INK4a} expression in actinic keratosis and Bowen's disease. Br J Dermatol. 2003 Nov; 149(5): 1006-1012.

114 Chang TG, Wang J, Chen LW, Hsu CY, Chang HW, Chen JS, et al. Loss of expression of the p16 gene is frequent in malignant skin tumors. Biochem Biophys Res Commun. 1997 Jan; 230(1): 85-88.

- 115 Küsters-Vandeveldde HVN, de Koning MNC, Melchers WJG, Quint WGV, de Wilde PCM, de Jong EMGJ, et al. Expression of p14^{ARF}, p16^{INK4a} and p53 in relation to HPV in (pre-)malignant squamous skin tumours. *J Cell Mol Med.* 2009 Aug; 13(8B): 2148-2157.
- 116 Kanellou P, Zaravinos A, Zioga M, Stratigos A, Baritaki S, Soufla G, et al. Genomic instability, mutations and expression analysis of the tumour suppressor genes p14^{ARF}, p15^{INK4b}, p16^{INK4a} and p53 in actinic keratosis. *Cancer Lett.* 2008 Jun; 264(1): 145–161.
- 117 Nindl I, Gottschling M, Krawtchenko N, Lehmann MD, Röwert-Huber J, Eberle J, et al. Low prevalence of p53, p16^{INK4a} and Ha-ras tumour-specific mutations in low-graded actinic keratosis. *Br J Dermatol.* 2007; 156 Suppl. 3: 34-39.
- 118 Brouxhon S, Kyrkanides S, O'Banion MK, Johnson R, Pearce DA, Centola GM, et al. Sequential down-regulation of E-cadherin with squamous cell carcinoma progression: loss of E-cadherin via a prostaglandin E₂EP2-dependent posttranslational mechanism. *Cancer Res.* 2007 Aug; 67(16): 7654-7664.
- 119 Koizumi M, Matsuzaki T, Ihara S. Expression of P-cadherin distinct from that of E-cadherin in re-epithelialization in neonatal rat skin. *Dev Growth Differ.* 2005 Feb; 47(2): 75-85.
- 120 Navarro P, Gómez M, Pizarro A, Gamallo C, Quintanilla M, Cano A. A role for the E-Cadherin cell-cell adhesion molecule during tumor progression of mouse epidermal carcinogenesis. *J Cell Biol.* 1991 Oct; 115(2): 517-533.
- 121 Margulis A, Zhang W, Alt-Holland A, Crawford HC, Fusenig NE, Garlick JA. E-cadherin suppression accelerates squamous cell carcinoma progression in three-dimensional, human tissue constructs. *Cancer Res.* 2005 Mar; 65(5): 1783-1791.
- 122 Chiles MC, Ai L, Zuo C, Fan CY, Smoller BR. E-cadherin promoter hypermethylation in preneoplastic and neoplastic skin lesions. *Mod Pathol.* 2003 Oct; 16(10): 1014-1018.

APÊNDICE

Tabela 7 – Características clínicas das amostras estudadas de hiperplasia pseudoepiteliomatosa

Caso	Lesão	Gênero	Idade	Localização	Recidiva
1	Leishmaniose	Feminino	22	Membro superior	Não
2	Leishmaniose	Masculino	29	Membro inferior	Não
3	Cromoblastomicose	Feminino	17	NA	Não
4	Cromoblastomicose	Masculino	74	Membro inferior	Não
5	Cromoblastomicose	Masculino	49	Membro inferior	Não
6	Leishmaniose	Masculino	38	Face	Não
7	Leishmaniose	Masculino	23	Membro inferior	Não
8	Leishmaniose	Masculino	44	Face	Não
9	Cromoblastomicose	Masculino	53	Membro inferior	Não
10	Cromoblastomicose	Masculino	51	Membro inferior	Não
11	Cromoblastomicose	Masculino	30	Membro inferior	Não
12	Cromoblastomicose	Masculino	59	Membro superior	Não
13	Cromoblastomicose	Masculino	56	Membro inferior	Não
14	Leishmaniose	Masculino	55	Dorso	Não
15	Cromoblastomicose	Masculino	58	Membro superior	Não
16	Cromoblastomicose	Masculino	57	Membro inferior	Não
17	Leishmaniose	Masculino	8	Membro superior	Não
18	Leishmaniose	Masculino	23	Dorso	Não

NA: não avaliado (prontuário não localizado).

Tabela 8 – Características clínicas das amostras estudadas de lesões pré-malignas

Caso	Lesão	Gênero	Idade	Localização	Ulceração	Recidiva	LN	Metástase
1	Cis	Feminino	75	Membro inferior	Não	Não	Não	Não
2	Cis	Feminino	75	Membro superior	Não	Não	Não	Não
3	CA	Feminino	43	SE	Não	Não	Não	Não
4	CA	Feminino	54	SE	Não	Não	Não	Não
5	CA	Masculino	49	Face	Não	Não	Não	Não
6	CA	Masculino	63	Face	Não	Não	Não	Não
7	CA	Masculino	50	Face	Não	Não	Não	Não
8	CA	Feminino	63	Face	Não	Não	Não	Não
9	Cis	Feminino	64	Face	Não	Não	Não	Não
10	Cis	Feminino	81	Pescoço	Não	Não	Não	Não
11	CA	Masculino	89	SE	Não	Sim	Não	Não
12	Cis	Feminino	54	Dorso	Não	Não	Não	Não
13	Cis	Masculino	68	Tórax	Sim	Não	Não	Não
14	Cis	Masculino	36	Pescoço	Sim	Não	Não	Não
15	Cis	Masculino	71	Tórax	Não	Não	Não	Não
16	CA	Masculino	74	Membro superior	Não	Não	Não	Não

Cis: carcinoma *in situ*; CA: ceratose actínica; SE: sem especificação da localização no prontuário/pedido de biópsia.

Tabela 9 – Características clínicas das amostras estudadas de carcinoma de células escamosas

Caso	Gênero	Idade	Localização	Ulceração	Recidiva	LN	Metástase	Lesões associadas
1	Masculino	77	Membro superior	Não	Não	Não	Não	Não
2	Feminino	58	Membro inferior	Sim	Não	Sim	Fígado	Não
3	Masculino	42	Membro inferior	Sim	Não	Não	Pulmão	Não
4	Masculino	33	Membro superior	Sim	Sim	Sim	Fígado	Queimadura
5	Masculino	91	Face	Não	Não	Não	Não	Não
6	Masculino	67	Face	Sim	Não	Não	Não	Não
7	Masculino	3	Dorso	Não	Não	Não	Não	Albinismo
8	Masculino	62	Face	Sim	Sim	Não	Não	Mordida de rato
9	Masculino	93	Tórax	Sim	Não	Não	Não	Xerodermia
10	Feminino	35	SE	Sim	Não	Não	Não	Albinismo
11	Masculino	72	Dorso	Sim	Sim	Não	Não	Não
12	Masculino	53	Membro inferior	Sim	Não	Não	Não	Não
13	Masculino	31	Tórax	Não	Não	Sim	Pulmão	EV
14	Masculino	73	SE	Não	Não	Não	Não	Não
15	Feminino	68	SE	Não	Não	Não	Não	Não
16	Feminino	68	SE	Sim	Não	Não	Não	Não
17	Feminino	78	Membro superior	Não	Não	Não	Não	Não
18	Feminino	63	SE	Não	Não	Não	Não	Não
19	Feminino	91	Face	Sim	Sim	Sim	Não	Não
20	Masculino	71	Membro inferior	Sim	Não	Não	Não	Não
21	Masculino	71	Face	Sim	Sim	Não	Não	Não
22	Masculino	61	Face	Sim	Sim	Não	SE	Não
23	Masculino	86	Face	Sim	Não	Não	Não	Não
24	Masculino	57	Face	Não	Não	Não	Não	Não
25	Feminino	72	Face	Sim	Não	Não	Não	Não
26	Masculino	51	Face	Sim	Não	Não	Não	Não
27	Feminino	48	Membro superior	NA	NA	NA	NA	NA
28	Masculino	90	Face	Não	Não	Não	Não	Não

SE: sem especificação da localização no prontuário/pedido de biópsia; NA: não avaliado (prontuário não localizado); EV: epidermodisplasia verruciforme.

Tabela 10 – Características imuno-histoquímicas das amostras de hiperplasia pseudo epiteliomatosa

Caso	Laminina-5	Proteína 16	E-caderina
1	Positivo difuso	Negativo	Perda parcial
2	Positivo difuso	Negativo	Perda parcial
3	Positivo focal	Negativo	Perda parcial
4	Positivo focal	Negativo	Perda parcial
5	Positivo focal	Negativo	Preservada
6	Positivo focal	Negativo	Perda parcial
7	Negativo	Negativo	Preservada
8	Positivo focal	Negativo	Preservada
9	Positivo focal	Positivo forte e difuso	Perda parcial
10	Positivo focal	Negativo	Perda parcial
11	Positivo focal	Negativo	Preservada
12	Positivo focal	Negativo	Perda parcial
13	Positivo focal	Positivo forte e difuso	Perda parcial
14	Positivo difuso	Negativo	Perda parcial
15	Positivo focal	Negativo	Perda parcial
16	Negativo	Negativo	Perda parcial
17	Positivo focal	Negativo	Perda parcial
18	Positivo difuso	Negativo	Perda parcial

Tabela 11 -- Características imuno-histoquímicas das amostras de lesões pré-malignas

Caso	Laminina-5	Proteína 16	Proteína 16 pele adjacente	E-caderina
1	Negativo	Positivo forte e difuso	Negativo	Perda parcial
2	Negativo	Positivo fraco e focal	Positivo fraco e focal	Perda parcial
3	Negativo	Negativo	Negativo	Perda parcial
4	Negativo	Negativo	Negativo	Perda parcial
5	Negativo	Positivo forte e difuso	Negativo	Perda parcial
6	Positivo focal	Positivo fraco e focal	Positivo fraco e focal	Perda parcial
7	Negativo	Negativo	Negativo	Perda parcial
8	Negativo	Positivo forte e difuso	Positivo fraco e focal	Perda parcial
9	Negativo	Positivo forte e difuso	Negativo	Perda parcial
10	Positivo focal	Positivo fraco e focal	Negativo	Perda parcial
11	Positivo focal	Negativo	Negativo	Perda parcial
12	Negativo	Positivo forte e difuso	Negativo	Perda parcial
13	Positivo difuso e fraco	Positivo forte e difuso	Positivo fraco e focal	Perda parcial
14	Positivo difuso e fraco	Positivo forte e difuso	Positivo fraco e focal	Perda parcial
15	Positivo difuso e fraco	Positivo forte e difuso	Negativo	Perda parcial
16	Negativo	Positivo fraco e focal	Negativo	Preservada

Tabela 12 -- Características imuno-histoquímicas das amostras de carcinoma de células escamosas

Caso	Laminina-5	Proteína 16	Proteína 16 pele adjaente	E-caderina	E-caderina pele adjacente
1	Positivo difuso	Negativo	Negativo	Perda parcial	Preservada
2	Positivo difuso	Negativo	Negativo	Perda parcial	Preservada
3	Positivo difuso	Positivo focal e fraco	Negativo	Perda parcial	Preservada
4	Positivo difuso	Negativo	Positivo focal e fraco	Perda parcial	Perda parcial
5	Positivo focal	Positivo focal e fraco	Negativo	Perda parcial	Preservada
6*	Positivo difuso	Positivo focal e fraco	Negativo	Perda parcial	Preservada
7	Positivo difuso	Positivo focal e fraco	Positivo focal e fraco	Perda parcial	Preservada
8	Positivo difuso	Positivo focal e fraco	Positivo focal e fraco	Perda parcial	Preservada
9	Positivo focal	Negativo	Positivo focal e fraco	Perda parcial	Perda parcial
10	Positivo difuso	Positivo focal e fraco	Negativo	Perda parcial	Preservada
11	Positivo difuso	Positivo focal e fraco	Positivo focal e fraco	Perda parcial	Preservada
12	Positivo difuso	Positivo focal e fraco	Positivo focal e fraco	Perda parcial	Preservada
13	Positivo focal	Positivo forte e difuso	Negativo	Perda parcial	Preservada
14*	Positivo focal	Negativo	Positivo focal e fraco	Perda parcial	Preservada
15	Positivo difuso	Positivo focal e fraco	Negativo	Perda parcial	Preservada
16*	Positivo difuso	Positivo focal e fraco	Negativo	Perda parcial	Preservada
17*	Positivo focal	Negativo	Negativo	Perda parcial	Preservada
18*	Positivo difuso	Negativo	Negativo	Perda parcial	Preservada
19	Positivo difuso	Positivo focal e fraco	Positivo focal e fraco	Perda parcial	Preservada
20	Positivo focal	Positivo focal e fraco	Positivo focal e fraco	Perda parcial	Preservada
21*	Positivo focal	Negativo	Negativo	Perda parcial	Preservada
22	Positivo difuso	Negativo	Negativo	Perda parcial	Preservada
23	Positivo difuso	Positivo forte e difuso	Positivo focal e fraco	Perda parcial	Preservada
24*	Positivo focal	Negativo	Negativo	Perda parcial	Preservada
25	Positivo difuso	Positivo focal e fraco	Positivo focal e fraco	Perda parcial	Preservada
26	Positivo focal	Negativo	Negativo	Perda parcial	Preservada
27*	Positivo focal	Negativo	Negativo	Perda parcial	Preservada
28	Positivo difuso	Positivo focal e fraco	Positivo focal e fraco	Perda parcial	Preservada

*Carcinoma de células escamosas micrôinvasor.

Expression of laminin-5 γ 2 chain in cutaneous pseudocarcinomatous hyperplasia

Background: Since the use of laminin-5 as a marker of invasiveness has been proposed by several authors, our objective was to compare the expression of this protein in pseudocarcinomatous hyperplasia and squamous cell carcinoma (SCC).

Methods: Sixty-four paraffin-embedded skin biopsy samples with diagnosis of epidermal hyperplasia (non-pseudocarcinomatous), pseudocarcinomatous hyperplasia, actinic keratosis/carcinoma *in situ*, microinvasive and frankly invasive SCC were obtained for immunohistochemical study.

Results: Adjacent normal epithelium and epidermal hyperplasia (non-pseudocarcinomatous) showed no staining. In pseudocarcinomatous hyperplasia, laminin-5 was positive, at least focally, in 14 of 16 (87.5%) samples and was concentrated in peripheral cells of elongated rete pegs and in migrating cells in dermis. In samples of microinvasive carcinoma ($n = 7$), the expression was observed in all cases and was concentrated in the leading edge of the tumor. All cases ($n = 21$) of frankly invasive SCC showed cells expressing laminin-5, at least focally. Well-differentiated areas of the tumor presented a pattern of expression in peripheral cells of tumor nests while a diffuse pattern of expression was observed in less differentiated areas.

Conclusion: We showed that cytoplasmic laminin-5 expression should not be used as a criterion of malignancy and is not useful in distinguishing pseudocarcinomatous hyperplasia from microinvasive and well-differentiated SCC.

Keywords: immunohistochemistry, laminin, laminin-5 γ 2, pseudocarcinomatous hyperplasia, skin

dos Santos AM, Carneiro FP, Queiroz AJR, Damasceno EAM, de Castro TMML, de Amorim RFB, Takano GHS, Junqueira MIMB, de Magalhães AV. Expression of laminin-5 γ 2 chain in cutaneous pseudocarcinomatous hyperplasia.

J Cutan Pathol 2011; 38: 871–875. © 2011 John Wiley & Sons A/S.

Aline M. dos Santos, Fabiana P. Carneiro, Amadeu J. R. Queiroz, Emanuel A. M. Damasceno, Tércia M. M. L. de Castro, Rivadávio F. B. de Amorim, Gustavo H. S. Takano, Maria I. M. B. Junqueira and Albino V. de Magalhães

Department of Pathology, University Hospital of Brasília, Brasília, Brazil

Fabiana Pirani Carneiro, MD,
 Centro de Anatomia Patológica, Hospital
 Universitário de Brasília, UNB, Via L2 Norte,
 SGAN 604/605, Módulo C, Brasília DF, CEP:
 70840-050, Brazil
 Tel: +55 61 3448 5499
 Fax: +55 61 3107 1907
 e-mail: fabianapirani@hotmail.com

Accepted for publication January 10, 2011

Pseudocarcinomatous epidermal hyperplasia consists of an exuberant proliferation of epithelium with downgrowth into the dermis and occurs in response to underlying infectious, inflammatory and neoplastic conditions.^{1–4} The histopathological features of pseudocarcinomatous hyperplasia may simulate well-differentiated squamous cell carcinoma (SCC), but

some features of carcinoma, including nuclear atypia; atypical mitotic figures; enlarged, hyperchromatic or pleomorphic nuclei; dyskeratosis; and vascular, lymphatic or perineural invasion are not usually seen with pseudocarcinomatous hyperplasia.^{5,6} The identification of an underlying disorder is also useful in excluding SCC in difficult cases. However,

dos Santos et al.

an incorrect diagnosis of carcinoma may occur, especially if a small biopsy is poorly oriented and has been taken from a peripheral, superficial or inflamed area of involvement by pseudocarcinomatous hyperplasia. Previous research on the immunohistochemical staining pattern of SCC vs. pseudocarcinomatous hyperplasia is limited.⁷⁻¹¹ In one study, the authors showed that well-differentiated SCC and pseudocarcinomatous hyperplasia stained similarly with proliferating cell nuclear antigen.¹² There is no immunohistochemical marker able to differentiate these two entities.

In neoplastic invasion occurs disruption of the basement membrane and infiltration of connective tissue. This process involves extracellular matrix components, including laminins, which represent a family of glycoproteins that are produced by epithelial cells and secreted into their basement membrane. In particular, laminin-5 consists of the $\alpha 3$, $\beta 3$ and $\gamma 2$ chains and connects the hemidesmosomes of epithelial cells with the underlying basement membrane.¹³ Normally, the basal cell layer expresses very low levels of laminin-5 protein, which is sufficient to maintain the basement membrane structure. In contrast, in invasive cells of cutaneous, cervical, anal and esophageal SCC, a great increase in laminin-5 synthesis has been showed.¹⁴⁻¹⁸ Preferential expression of the laminin γ -chain in carcinoma cells at the invasive front suggests that this molecule may play a role in the acquisition of a migrating and invading epithelial cell phenotype that is a prerequisite for malignancy. Considering this, our hypothesis was that the evaluation of laminin-5 $\gamma 2$ expression might be useful to differentiate pseudocarcinomatous hyperplasia from authentic squamous carcinoma. To our knowledge, there are no studies evaluating laminin-5 expression in pseudocarcinomatous hyperplasia.

Materials and methods

Biopsy samples

A total of 64 formalin-fixed, paraffin-embedded skin biopsy samples were retrieved from the file of the Pathologic Anatomy Center of the University Hospital of Brasília with the following diagnosis: epidermal hyperplasia (non-pseudocarcinomatous) (n = 5); pseudocarcinomatous hyperplasia (n = 16); actinic keratosis/carcinoma *in situ* (n = 15); microinvasive carcinoma (n = 7) and frankly invasive squamous carcinoma (n = 21). The slides of the selected specimens were previously reviewed by a single dermatopathologist, who confirmed the diagnosis. Inclusion criterion included adequate lesion volume in tissue blocks for immunohistochemical study. The samples of

epidermal hyperplasia (non-pseudocarcinomatous) and pseudocarcinomatous hyperplasia were all obtained from the border of active lesions of American tegumentary leishmaniasis and chromoblastomycosis that regressed after treatment. Pseudocarcinomatous hyperplasia was defined as a characteristically exuberant down-growing proliferation of rete pegs into dermis. The samples of epidermal hyperplasia (non-pseudocarcinomatous) presented discrete to moderate acanthosis and hyperkeratosis. Microinvasive SCC was considered to be a carcinoma with an extension of 2 mm or less into the dermis.

Immunohistochemistry

The streptavidin-biotin-peroxidase method was used. Silanized slides containing 4- μ m-thick sections of formalin-fixed and paraffin-embedded biopsies samples were deparaffinized and rehydrated. For antigen retrieval, the sections were incubated for 45 min in a heat waterbath at 95–99°C with ethylenediaminetetraacetic acid buffer pH 9.0. Then the slides were cooled at room temperature for 20 min. For blockade of endogenous tissue peroxidase, the slides were immersed in 3% H₂O₂ solution at room temperature for 30 min. After washing with phosphate buffered saline (PBS), the sections were incubated with primary antibody overnight at 4°C. The primary antibody used in immunohistochemical reaction was monoclonal laminin-5 $\gamma 2$ antibody (clone 4G1, dilution 1 : 50; DAKO Corporation, Carpinteria, CA, USA). After washing in PBS, the slides were incubated with a secondary antibody for 30 min at room temperature and subsequently with the streptavidin-biotin-peroxidase complex (LSAB + DAKO A/S, Glostrup, Denmark K-690) for 30 min at room temperature. All reactions were developed using a diaminobenzidine chromogen solution (Dab substrate chromogen system-K3468, DAKO). The counterstaining was performed with Harris hematoxylin. The sections were dehydrated, cleared and mounted. Sample of colon adenocarcinoma was used as positive control. Cells with cytoplasmic brown staining were considered positive.

Results

The immunohistochemical findings are summarized in Table 1. Cytoplasmic staining was not observed in samples of epidermal hyperplasia (non-pseudocarcinomatous) (Fig. 1A). In pseudocarcinomatous hyperplasia, laminin-5 was positive in 14 of 16 (87.5%) samples. In most cases, the expression was focal and concentrated in peripheral cells of elongated rete pegs and in isolated nests of cells in dermis

Expression of laminin-5 γ 2 chain in cutaneous pseudocarcinomatous hyperplasia

Table 1. Frequency of laminin-5 expression in cutaneous lesions

Lesion	Number of positive cells (%)
Epidermal hyperplasia (non-pseudocarcinomatous)	0/5 (0)
Pseudocarcinomatous hyperplasia	14/16 (87.5)
Actinic keratosis/ <i>in situ</i> carcinoma	5/15 (33.33)
Microinvasive squamous cell carcinoma	7/7 (100)
Frankly invasive squamous cell carcinoma	21/21 (100)

(Fig. 1B–D). The positivity in pseudocarcinomatous hyperplasia adjacent to ulceration was strong and was observed in migrating isolated cells (Fig. 1E,F). In actinic keratosis/*in situ* carcinoma, the cytoplasmic

positivity was detected only in 5 of 15 (33.33%) samples (Fig. 2A). In three of these samples, the expression was diffuse but weak (Fig. 2B) and in the other two the expression was focal. In samples of microinvasive carcinoma, the expression of laminin-5 was observed in all cases and concentrated in the invasion front of the neoplasia (Fig. 2C). All cases of frankly invasive SCC showed positive cells for laminin-5, at least focally. Well-differentiated areas of the neoplasia presented a pattern of expression in peripheral cells of tumor nests (Fig. 2D). The diffuse pattern of expression was observed in less differentiated areas (Fig. 2E,F). Adjacent normal epithelium showed no staining in the cytoplasm. In all our samples, no staining with

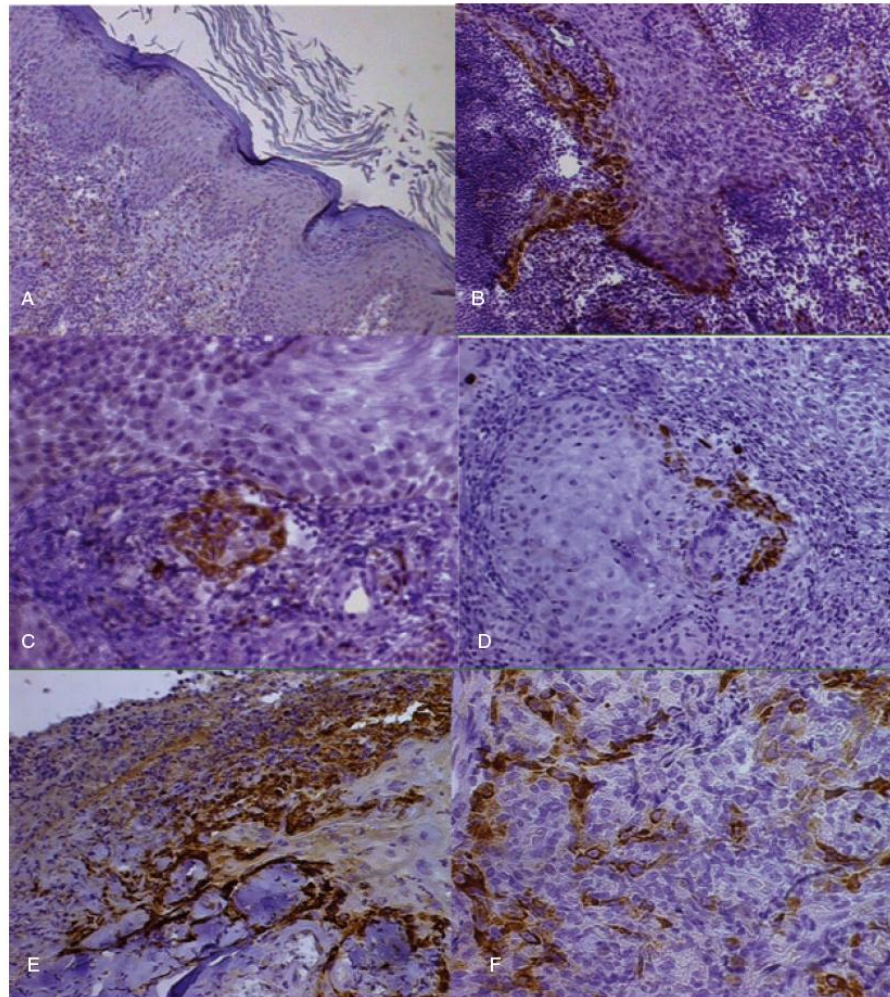


Fig. 1. laminin-5 immunohistochemical expression. Cells with cytoplasmic brown staining were considered positive. Epidermal hyperplasia (non-pseudocarcinomatous) was negative (A, $\times 100$). Positivity in peripheral cells of elongated rete pegs in pseudocarcinomatous hyperplasia (B, $\times 200$) and in isolated nests of cells in pseudocarcinomatous hyperplasia (C, D $\times 200$). Positivity in pseudocarcinomatous hyperplasia adjacent to ulceration (E, $\times 200$). Strong expression in migrating isolated cells adjacent to ulceration (F, $\times 400$).

dos Santos et al.

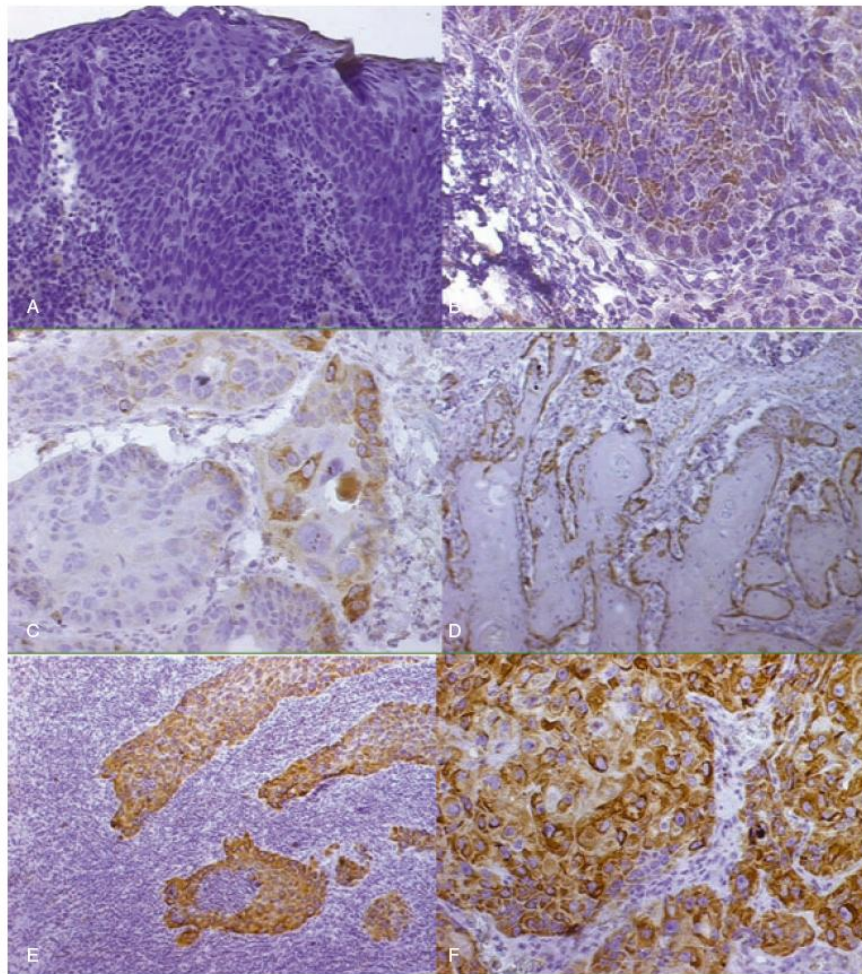


Fig. 2. laminin-5 imunohistochemical expression. Cells with cytoplasmic brown staining were considered positive. Negative sample of *in situ* carcinoma (A, $\times 200$). A weak expression in a sample of *in situ* carcinoma (B, $\times 400$). Positive cells in the invasion front of microinvasive carcinoma (C, $\times 400$). A pattern of expression in peripheral cells of tumor nests in frankly invasive SCC (D, $\times 200$) A diffuse pattern of expression in less differentiated areas of invasive SCC (E, $\times 100$; F, $\times 400$).

the antibody anti laminin-5 $\gamma 2$ was detectable at the level of the basement membrane of normal or dysplastic/atypical epithelium.

Discussion

Since the use of laminin-5 as a marker of invasiveness has been proposed by several authors, our objective was to compare the expression of this protein in pseudocarcinomatous hyperplasia and SCC. In our data, no expression of laminin-5 was observed in adjacent normal epithelium and in epidermal hyperplasia (non-pseudocarcinomatous), but most samples of pseudocarcinomatous hyperplasia expressed this marker. The positive cells were found focally, predominantly in peripheral cells of elongated rete pegs and in isolated nests of cells in dermis. The strong positivity in migrating keratinocytes adjacent

to ulcerated areas suggests the role of this protein as a regulator of keratinocyte migration in wound healing. The expression of laminin-5 in pseudocarcinomatous hyperplasia indicates that this protein is not specific for malignant cells, and its expression should not be used as a criterion of malignancy in the evaluation of cutaneous epithelial proliferations. To date, there is no study evaluating laminin-5 expression in pseudocarcinomatous hyperplasia of the oral cavity, but we anticipate that expression would be similar to that of the skin.

Although laminin-5 has been forwarded as a marker of invasiveness, cytoplasmic positivity has also been shown in some samples of intraepithelial neoplasia. In a previous study, the expression of the protein was found in only 34% of cases of cervical high-grade squamous intraepithelial lesions (HSIL),

Expression of laminin-5 $\gamma 2$ chain in cutaneous pseudocarcinomatous hyperplasia

while all the HSIL (100%) associated with invasive carcinoma were positive.¹⁹ In accordance with these results, 33% of our samples of actinic keratosis/*in situ* carcinoma showed positivity, but the expression was weak.

All samples of microinvasive and invasive carcinoma expressed laminin-5. In microinvasive carcinoma, a pattern of expression in the leading edge of the tumor was observed. In frankly invasive SCC, well-differentiated areas presented a pattern of expression in peripheral cells of tumor nests, while in less differentiated areas there was diffuse expression. This differential expression was also observed in samples of squamous carcinoma of the tongue.²⁰ The authors of the previous study also showed that patients with diffuse expression had a poorer prognosis than patients with the peripheral expression. Similar to SCC, the majority of cases of basal cell carcinoma also showed cytoplasmic expression of laminin-5 in a recent study.²¹

In previous studies that analyzed the expression of immunohistochemical markers in pseudocarcinomatous hyperplasia and SCC, authors suggest that the use of p53, E-cadherin and some metalloproteinases might be helpful in distinguishing these lesions in difficult cases.^{9,10,11} However, one of the limitations of these studies was the method of selection

of the samples that considered only the findings on microscopic examination in sections stained with hematoxylin–eosin.^{8,11} Because of this, we selected samples of pseudocarcinomatous hyperplasia from lesions of American tegumentary leishmaniasis and chromoblastomycosis that regressed after treatment. Additionally, in these studies there is no comment about the expression of the markers according to the grade of differentiation of the SCC. In our study, we were able to distinguish pseudocarcinomatous hyperplasia from less differentiated SCC in both conventional and immunohistochemical sections. The difficulty was to differentiate pseudocarcinomatous hyperplasia from well-differentiated SCC.

In conclusion, we showed that the pattern of expression of laminin-5 was similar in pseudocarcinomatous hyperplasia, microinvasive and in well-differentiated SCC. In light of this, we believe that the evaluation of expression of laminin-5 is not useful in distinguishing these lesions.

Acknowledgement

This study was supported by FAPDF (Fundação de apoio à pesquisa do DF).

References

- Biswas A, van Pittius DG, Stephens M, Smith AG. Recurrent primary cutaneous lymphoma with florid pseudoepitheliomatous hyperplasia masquerading as squamous cell carcinoma. *Histopathology* 2008; 52: 755.
- Reis-Filho JS, Gasparetto EL, Schmitt FC, Fillus-Neto J. Pseudoepitheliomatous hyperplasia in cutaneous malignant melanoma: a rare and misleading feature. *J Cutan Pathol* 2001; 28: 496.
- Goel R, Wallace ML. Pseudoepitheliomatous hyperplasia secondary to cutaneous aspergillus. *Am J Dermatopathol* 2001; 23: 224.
- Fu X, Jiang D, Chen W, Sun Bs T, Sheng Z. Pseudoepitheliomatous hyperplasia formation after skin injury. *Wound Repair Regen* 2007; 15: 39.
- Lynch JM. Understanding pseudoepitheliomatous hyperplasia. *Pathology Case Reviews* 2004; 9: 36.
- Wick MR, Patterson JW. Selected pseudo-neoplastic lesions of the skin. *Arch Pathol Lab Med* 2010; 134: 369. Review
- Galan A, Ko CJ. Langerhans cells in squamous cell carcinoma vs. pseudoepitheliomatous hyperplasia of the skin. *J Cutan Pathol* 2007; 34: 950.
- Pui JC. Distinguishing pseudoepitheliomatous hyperplasia from squamous cell carcinoma in mucosal biopsy specimens from the head and neck. *Arch Pathol Lab Med* 2006; 130: 764.
- Zarovnaya E, Black C. Distinguishing pseudoepitheliomatous hyperplasia from squamous cell carcinoma in mucosal biopsy specimens from the head and neck. *Arch Pathol Lab Med* 2005; 129: 1032.
- Lee YS, Teh M. p53 Expression in pseudoepitheliomatous hyperplasia, keratoacanthoma, and squamous cell carcinoma of skin. *Cancer* 1994; 73: 2317.
- Impola U, Jeskanen L, Ravanti L, et al. Expression of matrix metalloproteinase (MMP)-7 and MMP-13 and loss of MMP-19 and p16 are associated with malignant progression in chronic wounds. *Br J Dermatol* 2005; 152: 720.
- Li J, Lee YS. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression in pseudoepitheliomatous hyperplasia, keratoacanthoma and squamous cell carcinoma of the skin. *Ann Acad Med Singapore* 1996; 25: 526.
- Sugawara K, Tsuruta D, Ishii M, Jones JC, Kobayashi H. Laminin-332 and -511 in skin. *Exp Dermatol* 2008; 17: 473. Review.
- Natarajan E, Saeb M, Crum CP, Woo SB, McKee PH, Rheinwald JG. Co-expression of p16(INK4A) and laminin 5 $\gamma 2$ by microinvasive and superficial squamous cell carcinomas *in vivo* and by migrating wound and senescent keratinocytes in culture. *Am J Pathol* 2003; 163: 477.
- Skyldberg B, Salo S, Eriksson E, et al. laminin-5 as a marker of invasiveness in cervical lesions. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91: 1882.
- Baba Y, Iyama KI, Hirashima K, et al. Laminin-332 promotes the invasion of oesophageal squamous cell carcinoma via PI3K activation. *Br J Cancer* 2008; 98: 974.
- Nordström B, Einhorn N, Silfverswärd C, Sjövall K, Tryggvason K, Auer G. laminin-5 $\gamma 2$ chain as an invasivity marker for uni- and multifocal lesions in the lower anogenital tract. *Int J Gynecol Cancer* 2002; 12: 105.
- Stoltzfus P, Salo S, Eriksson E, et al. laminin-5 $\gamma 2$ chain expression facilitates detection of invasive squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Int J Gynecol Pathol* 2004; 23: 215.
- Noel JC, Fernandez-Aguilar S, Fayt I, et al. laminin-5 $\gamma 2$ chain expression in cervical intraepithelial neoplasia and invasive cervical carcinoma. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2005; 84: 1119.
- Kuratomi Y, Kumamoto M, Kidera K, et al. Diffuse expression of laminin $\gamma 2$ chain in disseminating and infiltrating cancer cells indicates a highly malignant state in advanced tongue cancer. *Oral Oncol* 2006; 42: 73.
- Mostafa WZ, Mahfouz SM, Bosseila M, Sobhi RM, El-Nabarawy E. An immunohistochemical study of laminin in basal cell carcinoma. *J Cutan Pathol* 2010; 37: 68.

ANEXO – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA
Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos

ANÁLISE DE PROJETO DE PESQUISA

Registro de Projeto: CEP-FM 010/2010.

Título: “Papel da Imuno-histoquímica na distinção entre hiperplasia epitelial pseudoepiteliomatosa e o carcinoma escamoso”.

Pesquisador Responsável: Aline Marques dos Santos.

Documentos analisados: Folha de rosto, carta de encaminhamento, declaração de responsabilidade, protocolo de pesquisa, termo de consentimento livre e esclarecido, cronograma, bibliografia pertinente e currículo (s) de pesquisador (es).

Data de entrega: 03/03/2010.

Parecer do (a) relator (a)

Aprovação

Não aprovação.

Data da primeira análise pelo CEP-FM/UNB: 26/03/2010.

Data do parecer final do projeto pelo CEP-FM/UNB: 22/04/2010.

PARECER

Com base na Resolução CNS/MS nº 196/96 e resoluções posteriores, que regulamentam a matéria, o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília decidiu **APROVAR** “*ad referendum*”, conforme parecer do (a) relator (a), o projeto de pesquisa acima especificado quanto aos seus aspectos éticos.

1. Modificações no protocolo devem ser submetidas ao CEP, assim como a notificação imediata de eventos adversos graves;
2. O (s) pesquisador (es) deve (m) apresentar relatórios periódicos do andamento da pesquisa ao CEP-FM, sendo o 1º previsto para 23 de outubro de 2010.

Brasília, 29 de Abril de 2010


 Prof. Elaine Maria de Oliveira Alves
 Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
 Faculdade de Medicina-UNB