



**Universidade Federal da Bahia
Instituto de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Imunologia**

TESE DE DOUTORADO

**MASTÓCITOS E OUTRAS CÉLULAS IMUNO-
ASSOCIADAS NOS SUBTIPOS DE CARCINOMA
BASOCELULAR EM POPULAÇÃO DE SALVADOR-
BA**

Jacqueline Ramos Machado Braga

Salvador-BA – Brasil

2006



**Universidade Federal da Bahia
Instituto de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Imunologia**



**MASTÓCITOS E OUTRAS CÉLULAS IMUNO-
ASSOCIADAS NOS SUBTIPOS DE CARCINOMA
BASOCELULAR EM POPULAÇÃO DE SALVADOR-
BA**

Jacqueline Ramos Machado Braga

Orientador Prof. Dr. Moysés Sadigursky

Salvador – BA- Brasil

2006

Ficha Catalográfica elaborada pela
Biblioteca do ICS / UFBA – Salvador – Bahia

B813 Braga, Jacqueline Ramos Machado,
Mastócitos e outras células imuno-associadas nos subtipos de Carcinoma
Basocelular em população de Salvador- BA. / Jacqueline Ramos Machado
Braga. – Salvador, 2006.
127 f.; il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências
da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Imunologia, 2006.

Orientador: Prof. Dr. Moysés Sadigursky.

1. Carcinoma Basocelular. 2. Infiltrado inflamatório. 3. Mastócitos. 4.
Subtipos de CBC. I. Sadigursky, Moysés. II. Universidade Federal da Bahia.
Instituto de Ciências da Saúde. III. Título.

CDU: 616-006.6



**Universidade Federal da Bahia
Instituto de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Imunologia**



MASTÓCITOS E OUTRAS CÉLULAS IMUNO- ASSOCIADAS NOS SUBTIPOS DE CARCINOMA BASOCELULAR EM POPULAÇÃO DE SALVADOR-BA

Jacqueline Ramos Machado Braga

Tese apresentada ao Colegiado do Curso de Pós-Graduação em Imunologia, do Instituto de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial obrigatório para obtenção do título de:

Doutor em Imunologia

Salvador-Bahia
Dezembro de 2006

*“A coisa mais bela que o homem pode experimentar é o mistério.
É essa a emoção fundamental que está na raiz
de toda a ciência e de toda a arte.”*

(Albert Einstein)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à Deus, aos meus pais e aos meus filhos, Thiago e Arthur, razão de tudo que faço e acredito.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, mestre e amigo, Prof. Dr. Moysés Sadigursky, pela contribuição, experiência, estímulo, incentivo e paciência dedicados durante meu processo de doutoramento.

Ao IPAC (Instituto de Patologia Cutânea) pelo fornecimento dos casos de Carcinoma Basocelular usados no presente trabalho.

À minha companheira de laboratório, Maria da Graça Silva Vieira, pelos ensinamentos na área de imunohistoquímica.

À Juçara Andrade, pelos cortes histológicos e colorações deste trabalho.

Aos meus filhos Thiago e Arthur, pelo simples fato de existirem e pela compreensão nos momentos em que a mãe privou-os de atenção.

À Marcello Virgílio Branco pelo carinho, compreensão e auxílio na elaboração dos gráficos e das cópias deste trabalho.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para que esse trabalho fosse realizado.

Obrigada a todos vocês.

SUMÁRIO

Lista de Ilustrações	iii
Lista de Siglas, Abreviaturas e Símbolos.....	v
Resumo	vii
Abstract.....	viii

1- INTRODUÇÃO	1
----------------------------	----------

2- REVISÃO DA LITERATURA.....	4
2.1-Aspectos gerais sobre o câncer	5
2.2-Imunologia dos tumores.....	7
2.2.1- Imunidade adaptativa	9
2.2.2.1- Linfócitos T.....	9
2.2.2.2- Linfócitos B.....	12
2.2.2.3- Mastócitos.....	13
A- Origem e distribuição	13
B- Propriedades Biológicas.....	16
B.1- Subtipos e heterogeneidade.....	16
B.2- Ativação e mecanismos de sinalização.....	17
B.3- Mediadores mastocitários	18
2.2.2- Imunidade natural	20
2.2.2.1- Células NK	20
2.2.2.2- Macrófagos.....	22
2.2.3- Mecanismos de escape do tumor	23
2.2.3.1- Expressão antigênica.....	23
2.2.3.2- Tolerância e Supressão	24
2.2.3.3- Facilitação	25
2.3- A pele	26
2.3.1- Organização do tecido linfóide cutâneo	27
2.3.2- As neoplasias da pele	28
2.4- O Carcinoma Basocelular (CBC).....	29
2.4.1- Epidemiologia.....	29
2.4.2- Etiologia e Genética Molecular	29
2.4.3- Carcinogênese do CBC.....	30
2.4.4- Biologia do CBC.....	32
2.4.5- Morfologia do CBC.....	33
2.5- Resposta imunológica em tumores cutâneos	35
2.6- Os mastócitos da pele	37
2.6.1- Os mastócitos e as neoplasias	37

3- OBJETIVOS	43
3.1- Objetivo Geral.....	44
3.2- Objetivos Específicos	44

4- METODOLOGIA.....	45
4.1- Amostras de tecido e análise histológica por microscopia	46
4.2- Histoquímica: técnica do azul de toluidina.....	46
4.3- Imunohistoquímica	47
4.4- Quantificação	48
4.5- Análise Estatística	48

5- RESULTADOS	49
5.1- Clínico-epidemiológicos	50

5.2- Morfológicos microscópicos	52
5.3- Histoquímicos e imunohistoquímicos	53
6- DISCUSSÃO	71
6.1- Dados Epidemiológicos	72
6.2- Infiltrado Inflamatório	74
6.2.1-Linfócitos T (CD3/ CD4/ CD8)	75
6.2.2- Linfócitos B (CD20)	76
6.2.3- Macrófagos (CD68)	76
6.2.4- Mastócitos	77
6.2.5- Proliferação Celular (Ki-67)	79
7- CONCLUSÃO	81
8- BIBLIOGRAFIA	84
9- ANEXO	109

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

TABELA 1: Dados epidemiológicos primários dos pacientes segundo padrão histológico do CBC.

FIGURA 1: Distribuição relativa dos casos pesquisados quanto ao sexo.

FIGURA 2: Distribuição relativa dos casos de acordo com o local da lesão.

TABELA 2: Dados estatísticos primários do número total de células imunomarcadas em todos os pacientes, independente do subtipo de CBC, na área total de 710,388 μm^2 .

FIGURA 3: Carcinoma Basocelular tipo Sólido Circunscrito. Coloração em HE.

TABELA 3: Dados estatísticos do número de células marcadas no subgrupo Sólido Circunscrito

FIGURA 4: Carcinoma Basocelular tipo Infiltrativo. Coloração em HE.

TABELA 4: Dados estatísticos do número de células marcadas no subgrupo Infiltrativo

FIGURA 5: Carcinoma Basocelular tipo Superficial. Coloração em HE.

TABELA 5: Dados estatísticos do número de células marcadas no subgrupo Superficial.

FIGURA 6: Carcinoma Basocelular tipo Adenóide. Coloração em HE.

TABELA 6: Dados estatísticos do número de células marcadas no subgrupo Adenóide.

FIGURA 7: Carcinoma Basocelular tipo Folicular. Coloração em HE.

TABELA 7: Dados estatísticos do número de células marcadas no subgrupo Folicular.

FIGURA 8 : Carcinoma Basocelular tipo Cístico. Coloração em HE.

TABELA 8: Dados estatísticos do número de células marcadas no subgrupo Cístico.

FIGURA 9: Carcinoma Basocelular tipo Morfea. Coloração em HE.

TABELA 9: Dados estatísticos do número de células marcadas no subgrupo Morfea.

FIGURA 10: Média total de células marcadas, caracterizando o infiltrado inflamatório no CBC.

FIGURA 11: Valores médios de linfócitos T CD3⁺ no total de casos estudados e em cada subtipo histológico de CBC.

FIGURA 12: Valores médios de linfócitos T CD4⁺ no total de casos estudados e em cada subtipo histológico de CBC

FIGURA 13: Imunohistoquímica de CBC tipo Adenóide evidenciando (à esquerda e acima) denso infiltrado inflamatório de linfócitos T CD4⁺.

FIGURA 14: Valores médios de linfócitos T CD8⁺ no total de casos estudados e em cada subtipo histológico de CBC.

FIGURA 15: Imunohistoquímica de CBC tipo Superficial evidenciando infiltrado inflamatório de linfócitos T CD8⁺.

FIGURA 16: Valores médios de linfócitos B no total de casos estudados e em cada subtipo histológico de CBC.

FIGURA 17: Imunohistoquímica de CBC tipo Infiltrativo evidenciando (à direita e acima) infiltrado inflamatório com linfócitos B.

FIGURA 18: Valores médios de macrófagos no total de casos estudados e em cada subtipo histológico de CBC.

FIGURA 19: Imunohistoquímica de CBC tipo Infiltrativo evidenciando os macrófagos do infiltrado inflamatório.

FIGURA 20: Valores médios de mastócitos no total de casos estudados e em cada subtipo histológico de CBC

FIGURA 21A: Imunohistoquímica de CBC evidenciando mastócitos ao redor de "ilhas" tumorais.

FIGURA 21B: Imunohistoquímica de CBC evidenciando mastócitos ao redor de "ilhas" tumorais.

FIGURA 22: Imunohistoquímica de CBC tipo Superficial evidenciando os mastócitos do infiltrado inflamatório.

FIGURA 23: Técnica histológica de azul de toluidina para marcação de mastócitos em CBC Superficial.

FIGURA 24: Valores médios de células em proliferação (Ki-67⁺) no total de casos estudados e em cada subtipo histológico de CBC.

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- AAT** (Antígenos Associados a Tumores)
- ACE** (Antígeno Carcioembriônico)
- ADCC** (Citotoxicidade Celular Dependente de Anticorpo)
- AFP** (Alfa-Fetoproteína)
- AMP cíclico** (Adenosina Mono-Fosfato cíclico)
- ATAT** (Antígenos de Transplante Associados a Tumores)
- BCNS** (Síndrome de Nevus Baso-Celular)
- bFGF** (Fator de Crescimento Básico do Fibroblasto)
- CBC** (Carcinoma Basocelular)
- CDC** (Citotoxicidade Dependente de Complemento)
- CPH ou MHC** (Complexo Principal de Histocompatibilidade)
- DAB** (Diaminobenzidina)
- DAG** (Diacilglicerol)
- FM** (Fatores Mitogênicos)
- G-CSF** (Fator Estimulador de Colônia Granulocítica)
- GM-CSF** (Fator Estimulador de Colônia do tipo Monócito-Granulócito)
- GM-CSF** (Fator Estimulador de Colônia do Macrófago e Granulócito)
- HE** (Hematoxilina- Eosina)
- HLA** (Antígeno Leucocitário Humano)
- IFN** (Interferon)
- Ig** (Imunoglobulina)
- IL** (Interleucina)
- INCA** (Instituto Nacional do Câncer)
- IP₃** (Inositol Trifosfato)
- LAK** (células Exterminadoras Ativadas por Linfocinas)
- LGG** (Linfócito grande Granular)
- LT** (Linfotoxina)
- MAF** (Fator de Ativação de Macrófagos)
- MCP-1** (Proteína Quimiotáctil do Monócito 1)
- MC_T** (Mastócitos de Mucosa)
- MC_{Tc}** (Mastócitos de Tecido Conectivo)
- MIF** (Fator de Inibição de Macrófagos)

MIP-1 α (Proteína Inflamatória do Macrófago 1 alfa)
NGF (Fator de Crescimento do Nervo)
NK (células *Natural Killer* ou assassinas naturais)
PAF (Fator Ativador de Plaquetas)
PGD₂ (Prostaglandina D₂)
PTK (Proteína-Quinase)
RANTES (Regulador da Ativação Normal de Célula T Expressa e Secretada)
SCF (Fator de *Stem Cell*)
TAM (Macrófagos Associados a Tumor)
Tc (linfócito T citotóxico)
TCR (Receptor de Célula T)
TGF β (Fator de Crescimento Transformante beta)
Th (linfócito T auxiliador ou helper)
TNF (Fator de Necrose Tumoral)
UV (Ultra-Violeta)
VEGF (Fator de Crescimento Endotelial Vascular)

RESUMO

O Carcinoma Basocelular (CBC) é o tipo mais comum e corresponde a 75% de todas as variedades de câncer de pele. Apesar de ser um tumor potencialmente maligno, tem um comportamento benigno na maioria dos casos. O papel dos mecanismos de defesa do hospedeiro nas neoplasias ainda é objeto de controvérsia. O presente estudo teve como objetivo quantificar mastócitos e as células do infiltrado inflamatório nos subtipos histológicos de Carcinoma Basocelular (CBC). Foram utilizados 71 casos de biópsias de pele com diagnóstico de Carcinoma Basocelular (CBC) não-recorrentes, agrupados de acordo com o subtipo de tumor (Circunscrito, Infiltrativo, Superficial, Folicular, Adenóide, Cístico e Morfea). Foi empregada a imuno-histoquímica com os anticorpos monoclonais anti-(CD3, CD4, CD8, CD68, CD20 e MAST cell) para a caracterização do infiltrado inflamatório peritumoral, além do Ki-67 para avaliar o índice de proliferação no tumor. Para a detecção dos mastócitos, foi usada também a técnica histológica do azul de toluidina. Do total de casos analisados, 70% eram homens, com idade média de $56,9 \pm 14,2$ anos e local mais freqüente da lesão na face (28,6%). Os subtipos mais freqüentes foram o Infiltrativo (26%) e o Superficial (23%). Com relação à composição do infiltrado inflamatório, os linfócitos TCD4⁺ corresponderam à população mais numerosa ($308,9 \pm 27,26$ células CD3⁺ e $216,2 \pm 22,23$ CD4⁺), seguida por mastócitos ($111,0 \pm 7,88$), linfócitos TCD8⁺ ($57,38 \pm 5,94$), linfócitos B ($55,9 \pm 6,83$) e macrófagos ($21,18 \pm 2,58$). Houve uma baixa atividade proliferativa das células neoplásicas ($47,61 \pm 7,48$), no entanto formas mais agressivas como o Morfea, apresentaram alta atividade proliferativa ($217,8 \pm 27,01$) e infiltrado rico em mastócitos ($211,7 \pm 19,73$). O subtipo Adenóide apresentou o mais denso infiltrado inflamatório dos subtipos de CBC, formado em sua maioria por linfócitos TCD4⁺ ($529,4 \pm 54,6$) ($p < 0,001$). O subtipo Cístico apresentou o mais pobre infiltrado inflamatório dos subtipos de CBC ($p < 0,001$). Estes dados permitem-nos concluir que o denso infiltrado inflamatório peritumoral no CBC consiste, em sua maioria, de linfócitos TCD4⁺, sugerindo uma resposta imunológica localizada mediada por célula e que os diferentes tipos celulares, que compõem o infiltrado inflamatório, variam seu número de acordo com o subtipo de tumor, o que poderia interferir na qualidade da resposta imunológica em cada caso. Existiu uma relação inversa entre o número de mastócitos e o de linfócitos T, sem correlação com a agressividade. Com isso supõe-se que as características próprias a cada subtipo de tumor talvez possam promover diferenças no micro-ambiente tecidual, levando à alterações na composição do infiltrado que poderiam tanto auxiliar quanto impedir o crescimento do tumor.

Palavras-chave: Carcinoma Basocelular; infiltrado inflamatório; mastócitos; subtipos de CBC.

ABSTRACT

Basal Cell Carcinoma (BCC) is the most common type of carcinoma and corresponds to 75% of all skin malignancies. In spite of constituting a potentially malignant tumor, it presents a benign behavior in most of the cases. The role of host mechanisms of defense in neoplasias is still a theme of debate. The present study aimed to evaluate the influence of mast cells and inflammatory infiltrate cells on the behavior of Basal Cell Carcinoma subtypes. 71 skin biopsies diagnosed as non-recurrent Basal Cell Carcinoma were grouped according to the tumor subtype (circumscribed, infiltrating, superficial, follicular, adenoid, cystic and morfea). Tissue samples were stained by immunohistochemistry using monoclonal antibodies (anti-CD3, CD4, CD8, CD68, CD20, Ki-67, and MAST cell), to characterize the peritumoral inflammatory infiltrate. For mast cell detection, we have also used the histology technique toluidin blue. From all cases analyzed, 70% were male, aged 56.9 ± 14.2 years old, and lesion was more common on the face (28.6%). The most frequent subtypes were the Infiltrating subtype (26%) and the Superficial subtype (23%). As to the inflammatory infiltrate, TCD4⁺ lymphocytes correspond to the most numerous population (308.9 ± 27.26 CD3⁺ cells and 216.2 ± 22.23 CD4⁺), followed by mast cells (111.0 ± 7.88), TCD8⁺ lymphocytes (57.38 ± 5.94), B lymphocytes (55.9 ± 6.83), and macrophages (21.18 ± 2.58). A low total cellular proliferate activity was observed (47.61 ± 7.48); however, more aggressive forms such as morfea presented high proliferate activity (217.8 ± 27.01), and an infiltrate rich in mast cells (211.7 ± 19.73). The adenoid subtype presented the densest inflammatory infiltrate of all BCC subtypes, which was mainly composed of TCD4⁺ lymphocytes (529.4 ± 54.6) ($p < 0.001$). The cystic subtype presented the poorest inflammatory infiltrate of all BCC subtypes ($p < 0.1$). From these data, we conclude that the dense peritumoral inflammatory infiltrate observed in BCC is composed mainly of TCD4⁺ lymphocytes, suggesting a local cell-mediated immune response. We also suggest that different cell types composing the inflammatory infiltrate are present in varying frequency according to the type of the tumor, what may interfere in the quality of the immune response in each circumstance. There was an inverse correlation between the number of mast cells and the number of T lymphocytes, which could not be related to aggressiveness. We suggest therefore that particularities of each tumor subtype may promote differences in tissue microenvironment, leading to modifications in the composition of the infiltrate that may help as well as impair tumor growth.

Key words: Basal Cell Carcinoma; inflammatory infiltrate; mast cells; BCC subtypes.

1 - INTRODUÇÃO

1- INTRODUÇÃO

Os estudos revelam que em países desenvolvidos, aproximadamente uma pessoa em cada cinco, poderá vir a óbito em decorrência de algum tipo de neoplasia, predominantemente em decorrência de neoplasias malignas, genericamente chamadas de câncer. Tal fato mostra a relevância de pesquisas incessantes sobre essa doença (INCA, 2006).

De acordo com a OMS (Organização Mundial da Saúde), o câncer afeta uma parcela expressiva da população mundial, sendo uma das principais causas de morte por doença na maioria dos países. A cada ano, pelo menos nove milhões de pessoas no mundo são acometidas com algum tipo de câncer (BRASILEIRO FILHO, 1998). No Brasil e no mundo, o tipo mais freqüente de câncer é o de pele, correspondendo a cerca de 25% de todos os cânceres diagnosticados (INCA, 2006).

O Carcinoma Basocelular (CBC) é o tipo mais comum e corresponde a 75% de todas as formas de câncer de pele. O CBC é um tumor maligno com comportamento indolente na maioria dos casos, apresentando altas taxas de cura quando tratado em seus estágios iniciais (CH'NG, S., et al., 2006). O aumento progressivo do número de casos de CBC no Brasil ocorre fundamentalmente pelo envelhecimento da população e pela exposição crônica aos raios UV. O número de casos novos de câncer de

pele não melanoma estimados para o Brasil em 2006 é de 55.480 casos em homens e de 61.160 em mulheres, de acordo com as Estimativas de Incidência de Câncer publicadas pelo INCA (2006). Estes valores correspondem a um risco estimado de 62 casos novos a cada 100 mil homens e 60 para cada 100 mil mulheres. Nos próximos anos, o CBC será um problema de saúde pública de primeira ordem e seu tratamento mais complexo devido à presença de múltiplas lesões em pessoas idosas.

Segundo Navarrete & Zemelman (2001) o Carcinoma Basocelular se associa a um infiltrado inflamatório mononuclear de magnitude variável e alguns estudos o têm tipificado usando técnicas de imunohistoquímica. De acordo com Toledo, P.L. e cols. (1999), este infiltrado inflamatório é composto de uma gama de tipos celulares que apresentam uma grande quantidade de moléculas marcadoras em sua superfície, algumas das quais aparecem momentaneamente em etapas particulares da diferenciação ou da ativação celular. As proteínas marcadoras de membrana podem ser usadas para distinguir as diferentes populações celulares, e muitas delas podem ser identificadas por meio de anticorpos monoclonais específicos. A caracterização deste infiltrado inflamatório pode fornecer elementos que ajudem no desenvolvimento de métodos terapêuticos mais direcionados a cada subtipo de tumor.

2- REVISÃO DA LITERATURA

2- REVISÃO DA LITERATURA

2.1- Aspectos gerais sobre o câncer

Dependendo da formação do indivíduo, o câncer pode ser considerado como um evento molecular, acidente embriológico, predisposição genética, deficiência imunológica, dano ambiental ou desafio epidemiológico; no entanto, é processo multifatorial, que envolve uma interação complexa de fatores endógenos e exógenos, a maior parte deles ainda por elucidar (RAMOS E SILVA, M., 2000).

Como outras doenças crônicas, o câncer é um dos mais antigos males da humanidade. Estima-se que 10 milhões de casos novos tenham sido diagnosticados durante o ano 2000 em todo o mundo, cerca de 900 mil só nos EUA. Apesar de todo progresso que a compreensão dos mecanismos moleculares trouxe ao diagnóstico, à terapêutica e à prevenção da doença, em especial nos últimos 25 anos, a sobrevivência do paciente com câncer pouco mudou (SATO, D. e cols, 2005). Conceitualmente, uma neoplasia é uma massa anormal de tecido cujo crescimento ultrapassa e se mostra desordenado, quando comparado ao dos tecidos normais, e persiste da mesma maneira excessiva, mesmo após o estímulo que provocou todas as mudanças ter cessado (WILLIS, R.A., 1952).

O processo de tumorigênese é caracterizado por um acúmulo sucessivo de alterações gênicas em determinada linhagem celular. Estas alterações podem ser mutações, deleções, amplificações, translocações e inserções, ou fenômenos epigenéticos que em última análise conferem à célula um funcionamento anômalo, escapando dos mecanismos fisiológicos de controle do crescimento e proliferação celular. Neste processo, alterações vão ocorrendo de maneira aleatória e, quando envolvem a inativação de genes supressores tumorais ou a

ativação de proto-oncogenes, conferem às células tumorais vantagens seletivas em relação às demais. Ocorre expansão deste clone e mais alterações gênicas vão sendo acumuladas, à medida que os ciclos de replicação vão se sucedendo. Um tumor, então, é o resultado de diversos ciclos de replicação celular, acúmulo de mutações e expansão clonal, de tal maneira que os clones que o compõem são o resultado de um processo de seleção (LERARIO, A.M., 2005).

As neoplasias são classificadas em benignas ou malignas. As primeiras possuem limites bem definidos com o tecido adjacente, sendo facilmente ressecadas, exceto em áreas de difícil acesso, como encéfalo, e não produzem tumores secundários distantes do principal, isto é, não produzem metástases. Sua nomenclatura é feita, de maneira geral, acrescentando o sufixo "OMA" após o nome do tecido de origem. As neoplasias malignas, chamadas genericamente de "câncer", têm em geral limites mal definidos com o tecido adjacente, devido ao seu crescimento invasivo, e produzem metástases, que é o principal critério de diferença entre neoplasias benignas e malignas. O termo "carcinoma" é usado para nomear as neoplasias malignas de origem epitelial e, para as de origem mesenquimal, usa-se o sufixo "sarcoma" após a denominação do tecido de origem. Além das células neoplásicas, os tumores têm células estromais as quais fornecem um arcabouço para sustentação e nutrição das mesmas. Quanto mais rápido o crescimento tumoral, menor a quantidade de estroma e mais comum a presença de necrose devido à nutrição deficiente das células em proliferação (HORA, C. e cols, 2003).

As células de um organismo multicelular vivem em uma verdadeira sociedade, sempre em interdependência. Qualquer mutação que dê origem a um comportamento celular diferente do habitual irá comprometer o equilíbrio do tecido ou mesmo do organismo. Assim sendo qualquer célula que carregue tal alteração deve ser eliminada para evitar, por exemplo, a formação de um tumor maligno. Mutação, competição e seleção natural, operando na população de células somáticas, são estágios importantes do desenvolvimento do câncer (BUCHI, D.F., 2002).

Segundo Gomes, NGLand. & Milanez, M.C. (1997), uma vez estabelecido, o tumor passa a agir como um "parasita", competindo com o organismo por nutrientes e debilitando-o. Além disto, substâncias com ações deletérias podem ser produzidas na interação tumor-hospedeiro, contribuindo para o quadro de caquexia visto nos pacientes portadores de neoplasias malignas.

2.2- A Imunologia dos tumores

O papel do sistema imune em prevenir o aparecimento e reagir contra um tumor já instalado tem sido tema de investigação de um grande número de pesquisadores em todo o mundo. No entanto, a importância real e a capacidade da resposta imunológica de impedir o desenvolvimento de uma neoplasia necessitam ainda melhor confirmação experimental. As modernas técnicas que vêm revolucionando a Biologia em geral e a Imunologia em particular - Biologia Molecular, anticorpos monoclonais, clones de linfócitos T - deram novo impulso nesta área de conhecimento, abrindo novas perspectivas. Um grande número de observações evidencia que o sistema imune tem importante papel no surgimento e desenvolvimento de um câncer (STITES, D.P. e cols, 1997).

Os tumores sólidos, estudados após ablação cirúrgica, são freqüentemente permeados por células mononucleares, marcando a presença do sistema imunológico (ROSEMBERG, S.A., 2001). O uso disseminado de drogas imunossupressoras em pacientes transplantados permitiu acumular dados de que em tal situação está muito aumentada a incidência de certas neoplasias (UROSEVIC, M. & DUMMER, R., 2002). Deve-se salientar que em vários casos desenvolvem-se raras formas de tumores e não ocorre simplesmente um aumento de predisposição às neoplasias comumente encontradas, levando a pensar que, nestes tumores, um particular controle imunológico deva estar envolvido (GUIMARÃES, R.E.S. e cols, 2003).

A imunidade específica antitumoral baseia-se na idéia de que a célula tumoral apresenta alguma diferença estrutural de sua contraparte normal e que esta dessemelhança seja reconhecida pelo sistema imune. A transformação maligna pode ser acompanhada por mudanças fenotípicas celulares que incluem perda de componentes normais ou ganho de outros não expressos na célula. Este componente não expresso, se for reconhecido pelo sistema imune como estranho, é um antígeno tumoral. Em realidade, a quase totalidade dos Antígenos Associados a Tumores (AAT) nada mais é do que a expressão de componentes normais em outras células, ou outro estado de diferenciação da mesma linhagem celular. A detecção destes antígenos tem sido útil no diagnóstico e acompanhamento dos pacientes (SALGUEIRO, M.I.C.P., e cols, 2000).

Freqüentemente, antígenos descritos como tumorais, quando investigados com maior profundidade, são antígenos de histocompatibilidade, grupo sangüíneo, de diferenciação ou oncofetais. Antígenos da Classe II do Complexo de Histocompatibilidade Principal (CPH) podem ser encontrados em diferentes tipos de leucemias e linfomas sendo que eles estão normalmente expressos em alguns linfócitos (OLIVEIRA, E.A. & SELL, A.M., 2002). Por outro lado, estes antígenos podem estar presentes em tumores de outras linhagens celulares onde normalmente não se observa sua expressão, como carcinoma ovariano ou melanoma (ANICHINI, A. e cols, 1993; PEOPLES, G.E. e cols, 1995). Os mais clássicos e estudados antígenos tumorais humanos são na verdade antígenos fetais ou oncofetais. (DISIS, M.L. & CHEEVER, M.A., 1996). São eles, o antígeno carcinoembriônico (CEA), descrito como sendo um marcador de adenocarcinomas do trato digestivo (FORONES, N.M. e cols, 1998) e a alfa-fetoproteína (AFP), o primeiro antígeno oncofetal descrito, e que está elevado em pacientes com carcinoma hepatocelular e carcinomas dos testículos e ovários (DIAS, M.B.K., 2003).

O reconhecimento pelo sistema imune de antígenos tumorais desencadeia uma resposta imunológica adaptativa que pode ser celular, humoral ou ambas. Além desse, outros mecanismos efetores reconhecendo a célula tumoral, podem destruí-la em um primeiro contato, sem necessidade de desencadeamento dos complexos processos de reconhecimento, proliferação e diferenciação do sistema imune. A isto se chama imunidade natural (SALGUEIRO, M.I.C.P., e cols, 2000).

2.2.1- Imunidade Adaptativa

A imunidade adaptativa induzida por antígenos tumorais é essencialmente semelhante àquela evocada contra transplantes dependentes de célula T. A ativação de célula T inclui a geração das subclasses auxiliar (T_a ou T_h) e supressora (T_s), assim como linfócitos T citotóxicos/reguladores (T_c/T_{reg}). Após a ativação antígeno-específica as células T_h secretam citocinas que ativam as células T_c, macrófagos e células *natural killer* (NK) que produzem outras citocinas como o Fator de Necrose Tumoral (TNF) que tem ação lítica direta sobre as células do tumor (STITES, D.P. e cols., 1997).

2.2.1.1- Linfócitos T

Virtualmente todos os componentes efetores do sistema imune têm potencial para contribuir para a erradicação de células tumorais. A resposta mediada por célula T é inquestionavelmente a mais importante resposta do hospedeiro para o controle do crescimento do tumor; sua responsabilidade relaciona-se tanto à destruição direta das células neoplásicas, como à ativação de outros componentes do sistema imune (BOON, T. e cols., 1994).

As células T derivam de células-tronco da medula óssea, mas, de modo diferente dos linfócitos B, não se diferenciam na medula - migram em estágio

ainda muito precoce para o timo, que possui o micro-ambiente especializado para a diferenciação e maturação dessas células. Quando chegam ao timo, determinados linfócitos já estão comprometidos com a diferenciação para linhagem T, posto que expressam, nesse estágio, o antígeno CD7 na membrana e o antígeno CD3 no citoplasma. Essas células progenitoras, no timo, podem transformar-se em células dendríticas intratímicas, assim como em timócitos $\gamma\delta$ e $\alpha\beta$. Interações com o estroma tímico levam à expressão dos marcadores específicos da linhagem T. Esses linfócitos T maduros serão TCR $\alpha\beta$ +CD3+CD5+CD2+CD7+CD4+CD8-, TCR $\alpha\beta$ +CD3+CD5+CD2+CD7+CD4-CD8+ ou TCR $\gamma\delta$ +CD3+CD7+CD2+CD4-CD8-. Cerca de 10% das células mononucleares circulantes apresentam fenótipo de células TCD3+CD7-. Em sua maioria são células auxiliaadoras de memória TCR $\alpha\beta$ +CD3+CD4+CD7- CD45RO+ CD45RA-. Nessa etapa deixam o timo, entram na circulação e migram para os órgãos linfóides periféricos (linfonodos e pele, entre outros) (SANCHES, J.A., 2006).

Células T antígeno-tumorais específicas ligam-se ao complexo antigênico-granzima receptor tumoral MHC I e destroem a célula tumoral via liberação de grânulos contendo granzimina B, perforina e via indução da apoptose, através do mecanismo FAS (WARD, L.S., 2002). A imunidade das células T reflete a função de duas subpopulações: as restritas à classe II ou T *helper* ou auxiliares (células Th - CD4⁺), que atuam secretando citocinas para ativar outras células efetoras e induzir a resposta inflamatória, e as restritas à classe I ou T citotóxicas (células Tc- CD8⁺) que também secretam citocinas, mas têm efeito principal na lise das células tumorais. Se de um lado já eram conhecidas as células e os mediadores envolvidos nas defesas dos humanos, só há pouco tempo foi documentado o fato de que a população de células TCD4⁺ (T helper) é heterogênea, sendo constituída de duas subpopulações: as células Th1 e Th2 (JANEWAY, C.A. e cols, 2002). As células Th1 e Th2 são reguladas por citocinas. A IL-12 e o IFN γ produzidos pelas células Th1 e outras células inflamatórias favorecem a resposta tipo Th1 e inibem as células Th2, enquanto

que a IL-4 e a IL-2, produzidas pelas células Th2 e queratinócitos, favorecem a resposta Th2 e têm efeitos negativos nas células Th1 (VIDRIO, R.M.G., 2003)

A contribuição de cada subpopulação pode variar de acordo com o tipo de tumor, visto que as células tumorais podem expressar antígenos de classe II ou I, o que dificulta a ação integral da resposta imune anti-tumor. As linfocinas, secretadas pelas células T, fazem parte da família das Citocinas, juntamente com as interleucinas, as monocinas, os fatores de crescimento, os interferons e as quimiocinas (FUMAGALLI, L.A. & BRIVIO, F., 2006). Na realidade, segundo Thomas H & Balkwill FR (1991), o termo Citocina descreve um grupo de proteínas reguladoras celulares envolvidas no controle do crescimento celular, diferenciação na embriogênese, imunidade e inflamação. Elas têm baixo peso molecular, são produzidas localmente e agem de maneira autócrina ou parácrina. As citocinas mais importantes na Imunologia dos tumores são as que seguem:

1. INTERLEUCINA 2 (IL-2): Esta linfocina é essencial para a divisão da célula T e a diferenciação de células B em plasmócitos. Também é importante na proliferação de células NK (Exterminadoras Naturais ou *Natural Killer*) e na geração de células LAK (células Exterminadoras Ativadas por Linfocinas) a partir dos precursores. Enquanto que células NK mostram citotoxicidade restrita a um limitado tipo de células tumorais *in vitro*, as células LAK são capazes de destruir células de vários tipos de tumor (THOMAS, H. & BALKWILL, F.R., 1991).

2. FATOR DE INIBIÇÃO DA MIGRAÇÃO DE MACRÓFAGOS (MIF): Citocina pró-inflamatória, imunomodulador glicocorticóide-induzido, além de regulador do crescimento tumoral. O MIF liga-se a receptores na membrana de macrófagos aumentando o nível de AMP cíclico intracelular, resultando no aumento da polimerização de microtúbulos e diminuição da migração. Sua função é provavelmente a de deter macrófagos no sítio antigênico tumoral (KAMIMURA, A. e cols, 2000).

3. FATOR DE NECROSE TUMORAL (TNF): É uma citocina pró-inflamatória, descoberta inicialmente no soro de ratos ao longo de infecções com endotoxinas bacterianas. Mais tarde, esta mesma citocina foi descoberta em camundongos, coelhos e no homem. Posteriormente se identificaram duas formas moleculares denominadas TNF- α ou Caquexina e TNF- β ou Linfotóxina (LT). O TNF- α produz necrose hemorrágica de tumores, induz apoptose em alguns tumores e linhagens celulares transformadas e produz caquexia ao estimular a lipólise e a lipogênese hepática além de inibir a atividade da lipase nos adipócitos (ANAYA, J.M., 2003). O TNF- β pode lisar algumas células tumorais *in vitro* e é, também, diretamente citotóxica quando injetada em um tumor "*in situ*". Seu significado *in vivo* não é conhecido. Embora não seja completamente responsável pela capacidade de destruição das células Tc, o TNF- β pode amplificar a destruição mediada por células T por outros mecanismos (OSSA, J.E., 1988).

4. INTERFERONS (IFNs): Originalmente descritos como agentes antivirais, os Interferons (IFN) foram investigados como potenciais agentes anticâncer por causa de sua atividade antiproliferativa e efeitos citotóxicos, sua habilidade de ativar componentes específicos do sistema imune e sua moderada toxicidade. Propriedades antivirais e imunomodulatórias dos diferentes tipos de IFN sobrepõem-se, apesar de que IFN γ é consistentemente o imunomodulador mais eficiente (WADLER, S., 1992).

2.2.1.2- Linfócitos B

Eles são classicamente definidos pela presença de imunoglobulinas de membrana. Estas proteínas são produzidas pelos próprios linfócitos B e inseridas na membrana da superfície celular, que atuam como receptores específicos de antígenos. As células B e os plasmócitos são as únicas células capazes de produzir anticorpos. Entre os vários antígenos expressos na superfície dessas células, os CD19, CD20 e CD22, são atualmente os principais

marcadores utilizados na identificação de células B humanas e em camundongos (LAI, L. e cols, 1998).

Os linfócitos B com imunoglobulinas de superfície, reativas a antígenos do tumor, têm papel de ligar, processar e apresentar antígenos tumorais induzindo a resposta da célula T para o tumor (SCHREIBER, H., 1999).

Os mecanismos através dos quais os anticorpos medeiam a lise tumoral são: anticorpos fixadores do complemento que ligam-se à membrana da célula tumoral, promovendo a montagem dos componentes do complemento, criando poros na membrana e resultando na perda da integridade osmótica e bioquímica da célula neoplásica (MACHADO, P.R.L., e cols, 2004). O outro mecanismo é a Citotoxicidade Mediada por Anticorpo (ADCC) na qual os anticorpos, geralmente os da classe IgG opsonizam as células tumorais, permitindo que as células que têm receptores Fc promovam a lise da célula tumoral (LIMA, C.H., 2006).

2.2.1.3- Mastócitos

A- Origem e Distribuição

Os mastócitos foram descritos pela primeira vez em 1878 quando Paul Ehrlich, ainda estudante de Medicina, descobriu que algumas células, chamadas plasmócitos pelos histologistas, em determinado momento, se enchiam de grânulos que se coravam de vermelho quando tratados com um corante azul de anilina básica (MOTA, I., 1995). Desta forma ficou definida a diferença entre os plasmócitos e as células que se coravam metacromaticamente, a partir daí, chamadas de mastócitos (*Mastüng*). A metacromasia é uma resposta à interação do corante com a heparina ácida, um constituinte dos grânulos dos mastócitos (KRISHNASWAMY, G. e cols, 2001). Para evidenciar a metacromasia, utiliza-se a técnica do azul de Toluidina (AT), descrita por Luna, L. (1968). O AT

é um corante básico que forma ligações eletrostáticas com os radicais ácidos dos tecidos.

Os mastócitos originam-se na medula óssea, provenientes de células progenitoras hematopoiéticas CD34⁺, que também originam linfócitos, eritrócitos, megacariócitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos e monócitos (KRISHNASWAMY, G. e cols, 2001). Os mastócitos têm diferenciação terminal nos tecidos. Em certo momento, os progenitores dos mastócitos humanos deixam a medula óssea e tornam-se células agranulares indiferenciadas na circulação periférica, amadurecendo sob influências micro-ambientais locais e se diferenciando *in situ* (GALLI, S.J., 1990; KNUDSEN, T. & JOHANSEN, T., 1990).

Alguns estudos demonstraram que os mastócitos expressam o receptor para o Fator "Stem Cell" (receptor SCF ou c-kit) que se liga ao SCF, um fator de crescimento específico para mastócitos, produzido por fibroblastos (VALENT, P., 1995; GALLI, S.J. e cols, 1995). As interações entre o SCF e o c-kit são cruciais para o crescimento e desenvolvimento dos mastócitos, pois o SCF promove diferenciação de células precursoras pluripotenciais, tem ação pleiotrópica, é um fator quimiotáctil e induz a liberação de mediadores (VLIAGOFTIS, H., e cols, 1997). Mutações no c-kit e níveis elevados do proto-oncogene do c-kit têm sido associados com a mastocitose (NAGATA, H., et al, 1998; WOROBEK, A.S. e cols, 1998).

Os mastócitos distribuem-se normalmente ao longo dos tecidos conectivos, onde eles são especialmente numerosos sob as superfícies epiteliais da pele, no sistema respiratório, nos tratos gastrointestinal e genito-urinário, adjacentes a vasos sangüíneos e linfáticos e próximos ou dentro de nervos periféricos, tornando seus produtos disponíveis para uma larga variedade de tipos celulares incluindo fibroblastos, células epiteliais glandulares, nervos, células endoteliais vasculares, células musculares lisas e células do sistema imune (BIENENSTOCK, J., e cols, 1989). Estima-se que, se todos os mastócitos fossem colocados juntos, eles poderiam formar um órgão do tamanho do baço

(BRADDING, P. & HOLGATE, S.T., 1999). Os locais de distribuição dos mastócitos têm relação com a proximidade de parasitas e outros patógenos, além de antígenos ambientais que entram em contato com a pele e superfícies mucosas (GALLI, S.J., 1993).

Os mastócitos formam uma população heterogênea de células com diferenças aparentes em seu desenvolvimento, conteúdo de mediadores, ultra estrutura e habilidade para interagir com o ambiente local (BLOOM, G.D., 1984). Estas células, nos diversos sítios anatômicos, ou num mesmo sítio, podem ter diferenças substanciais na sensibilidade a agentes que induzem ativação e liberação de mediadores, e resposta a agentes farmacológicos. A distribuição tecidual e a vasta gama de mediadores lipídicos, proteases, proteoglicanos e citocinas identificadas como produtos potenciais dos mastócitos humanos, explicam como estas células interessantes têm o potencial de contribuir para tão diversos eventos biológicos (SCHWARTZ, L.B., 1989).

A heterogeneidade dos mastócitos é regulada por muitos fatores, incluindo certas citocinas, que influenciam no estágio de maturação, diferenciação, proliferação e outras características celulares (STEVENS, R.L. & AUSTEN, K.F., 1989). Experimentos em camundongos indicam que as características fenotípicas das populações de mastócitos podem mudar algumas vezes de forma reversível, em resposta às alterações do micro-ambiente. Esta flexibilidade frente às mudanças pode explicar a facilidade que os mastócitos apresentam de mudar em resposta a estímulos fisiológicos ou patológicos (KITAMURA, Y., 1989; GALLI, S.J., 1990).

Os mastócitos estão relacionados com diversos processos fisiológicos, patológicos e imunológicos, incluindo reações alérgicas, remodelamento tecidual, reparo de ferimentos, fibrose patológica, artrite, angiogênese e reações do hospedeiro à neoplasias (METCALFE, D.D., e cols, 1997). O mastócito expressa o receptor FC ϵ RI que se liga com alta afinidade com a porção Fc do anticorpo IgE (KINET, J-P; 1989). Quando os anticorpos IgE se

ligam aos receptores destas células, reconhecendo antígenos multivalentes específicos, os mastócitos sofrem um padrão característico de mudanças bioquímicas e morfológicas, coletivamente denominadas degranulação anafilática que resulta na liberação de um painel de mediadores biologicamente ativos (SCHWARTZ, L.B. & AUSTEN, K.F.; 1984).

B- Propriedades Biológicas

B.1- Subtipos e Heterogeneidade

Em humanos, dados estruturais, bioquímicos e funcionais, diferenciam dois tipos de subpopulações de mastócitos: MC_T – mastócitos de mucosa e MC_{TC} – mastócitos do tecido conectivo (SCHWARTZ, L.B., 1987; 1998). Os MC_T expressam predominantemente triptase e localizam-se em superfícies mucosas em íntima relação com células T, especialmente as do tipo Th2. Esta subpopulação de mastócitos pode aumentar em número nas doenças alérgicas e parasitárias, ou diminuir, como observado em pacientes infectados com HIV (CHURCH, M.K. & LEVI-SCHAFFER, F., 1997).

Os MC_{TC} contêm mais heparina que os MC_T e respondem a neuropeptídios. No entanto, a expressão fenotípica é determinada pelas condições microambientais locais, como a presença de SCF (Fator de *Stem Cell*), NGF (Fator de Crescimento do Nervo), IL6 (Interleucina 6) e IL4 (OCHI, H. et al., 2000). Os MC_{TC} predominam na pele e tecidos subcutâneo e sinovial e expressam triptase, quimase, carboxipeptidase e catepcina G. Aumentam em número nas doenças fibróticas mantendo o seu número constante em doenças alérgicas, parasitárias e na AIDS. Acredita-se que os MC_{TC} sejam importantes na remodelagem tissular e angiogênese, enquanto que os MC_T possuem papel central na inflamação. Ambos os tipos, entretanto, expressam receptor FcεRI (CHURCH, M.K. & LEVI-SCHAFFER, F., 1997).

B.2- Ativação e Mecanismos de Sinalização

O mastócito pode ser ativado por diferentes fatores, dentre eles: ligação da IgE nos receptores de alta afinidade $Fc\epsilon RI$, anafilotoxinas (C3a e C5a), citocinas (IL1, SCF), neuropeptídios (SP, NT, SGF, CGRP), estímulos físicos (calor, frio, fricção, pressão), toxinas bacterianas, venenos, polipeptídios biológicos (áscaris, mariscos), polímeros (Dextran) ou drogas (AAS, álcool, codeína, morfina, polimixina B, anfotericina B, quinina, reserpina, substância iodada de contraste, etc.) (GUNNAR, N. & METCALFE, D.D., 1996).

A grande liberação de mediadores mastocitários que ocorre durante as reações anafiláticas envolvendo alimentos, veneno de insetos ou drogas pode levar à morte do hospedeiro (SHARDENDORF, D. et al, 1995). Esta resposta imunológica pode ser caracterizada como um padrão exagerado de ativação dos mastócitos ou basófilos que, quando propriamente regulado e localizado, traz grandes benefícios ao hospedeiro (WASSERMAN, S.I., et al, 1988). Entretanto, em algumas pessoas, principalmente as atópicas, os mesmos elementos efetores celulares e humorais podem ser mobilizados em resposta à sensibilização com pólen, pêlo animal, poeira e outras substâncias intrinsecamente inócuas, resultando nas manifestações alérgicas (MARSH, D., 1988).

A ligação entre a IgE e os receptores de alta afinidade $Fc\epsilon RI$, ativa uma proteína-quinase (PTK) e uma proteína G heterotrimérica que levam à ativação de uma cascata de sinalização envolvendo a via da Fosfolipase A₂, o que leva à produção de mediadores lipídicos, prostaglandina D₂ (PGD₂) ou leucotrieno C₄ (LTC₄), que são liberados do mastócito por exocitose de grânulos (KRISHNASWAMY, G. et al., 2001).

B.3- Mediadores Mastocitários

Os mastócitos são caracterizados por sua habilidade de sintetizar, estocar e liberar numerosas moléculas de efeito biológico. Em humanos, estas incluem aminas biogênicas (histamina), proteoglicanos (heparina e sulfato de condroitina), proteases neutras (triptase, quimase e carboxipeptidase A) e hidrolases ácidas. Outros mediadores, como o Fator Ativador de Plaquetas (PAF) e produtos do metabolismo do ácido aracdônico, são gerados apenas após a estimulação destas células. Existem três categorias de mediadores mastocitários: os pré-formados (de baixo peso molecular e armazenados em grânulos), os de nova geração (sintetizados a partir dos lipídios da membrana) e as citocinas (DIMITRIADOU, V. & KOUTSILIERIS, M.,1997; SCHWARTZ, L.B., et al, 1987).

Dentre os mediadores pré-formados, destacam-se a Histamina, as proteases neutras (triptase e quimase) e os proteoglicanos (Heparina e sulfato de condroitina E). A Histamina, produzida pela ação da enzima histidina-decarboxilase, atua através de três tipos de receptores específicos: H₁, H₂ e H₃. Nos receptores H₁ e H₃, a histamina exerce efeitos do tipo inflamatório, atuando como uma potente amina vasoativa, aumentando a permeabilidade vascular e a secreção de muco, contribuindo para o recrutamento de células circulantes. Os efeitos mediados pelo receptor H₂ são do tipo antiinflamatório, funcionando como um sistema de retroregulação (FALAUS, A. & MERETEY, K., 1992).

As proteases neutras são enzimas proteolíticas. A Quimase, presente em maior quantidade na subpopulação MC_{TC} estimula a secreção mucosa nos brônquios, enquanto que a Triptase é liberada, juntamente com a histamina, durante a degranulação e ativa o fibrinogênio, a collagenase e o C3 por via alternativa (SALMÚN, N.B. et al, 1994).

O proteoglicano dominante nos mastócitos é a Heparina. Uma vez liberada, ela pode afetar a estabilidade ou a função de outros mediadores mastocitários. Atua como anticoagulante e anticomplemento, melhora a ligação do colágeno com a fibronectina, auxiliando o remodelamento tecidual e ativando numerosos fatores de crescimento (KRISHNASWAMY, G. et al., 2001).

Dentre os mediadores lipídicos de nova geração, existem os Leucotrienos (LTB_4 , LTC_4 , LTD_4 e LTE_4), as Prostaglandinas (PGD_2) e o PAF. A PGD_2 regula negativamente a degranulação do mastócito, enquanto que o PAF tem ação broncoconstrictora direta. Os leucotrienos têm efeitos semelhantes aos da histamina, porém mais potentes, tardios e prolongados (CHURCH M.K. & LEVI-SHAFFER, F.J., 1997).

Os mastócitos humanos também sintetizam e liberam um painel de citocinas multifuncionais como a IL-1, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-13, IL-16, $TNF\alpha$ (Fator de Necrose Tumoral alfa), GM-CSF (Fator Estimulador de Colônia do Macrófago e Granulócito) e também alguns dos mais poderosos fatores de crescimento como o bFGF (Fator de Crescimento Básico do Fibroblasto), o VEGF (Fator de Crescimento Endotelial Vascular) e o $TGF\beta$ (Fator de Crescimento Transformante beta), além de quimiocinas como MIP-1 α (Proteína Inflamatória do Macrófago 1 alfa), MCP-1 (Proteína Quimiotática do Monócito 1) e RANTES (Regulador da Ativação Normal de Célula T Expressa e Secretada) (GORDON, J.L. et al, 1990; CHURCH, M.K., et al, 1991; AOKI, M. et al, 2003).

Estas citocinas não apenas regulam a produção de IgE e outras respostas imunes, mas também afetam a inflamação, a homeostase, a hematopoiese, a angiogênese, a remodelagem tissular e o desenvolvimento ou resistência a tumores (GALLI, S.J., et al, 1991; LICHTENBELD, H.H., et al, 1996; DETHLEFSEN, S.M., 1995).

2.2.2- Imunidade Natural

A imunidade específica contra os antígenos tumorais não é a única observada na resistência imunológica contra as neoplasias. A observação de que leucócitos periféricos de indivíduos normais são capazes de impedir o crescimento de células tumorais *in vitro*, e mesmo destruí-las, levou à conceituação de imunidade inata do indivíduo alterando a idéia da necessidade de um contato prévio com o antígeno. Esta imunidade natural sabe-se hoje, é desenvolvida por três tipos de célula; duas são bem caracterizadas, os granulócitos e os macrófagos, embora o modo de atuação dos granulócitos não esteja bem estudado. A terceira população é mais heterogênea e conhecida como células NK (ou *Natural Killer*). A imunidade natural não é observada somente contra tumores e sabe-se que ela atua também em infecções virais e está presente na rejeição de transplantes. Embora independente dos mecanismos de reconhecimento do sistema imune específico clássico, esta resposta é regulada por produtos deste sistema através de interferon e de interleucinas (JANEWAY, C.A. Jr & MEDZHITOV, R., 2002).

2.2.2.1- Células NK

São grandes linfócitos (linfócitos grandes granulares - LGG) derivados da medula óssea. Apresentam numerosos grânulos citoplasmáticos, contendo perforinas, granzimas e proteoglicanos (como as células Tc). A exocitose desses grânulos pode lisar osmoticamente as células alvos e induzir a morte apoptótica pelas vias perforina/granzima B (TRINCHIERI, G., 1989).

As células NK (*Natural Killer*) podem matar através do mesmo mecanismo utilizado pelos linfócitos T citotóxicos, gerados durante a resposta imune adaptativa; no entanto, a morte pela célula NK é ativada por receptores invariáveis e já se sabe que tumores que perdem a expressão de moléculas de

MHC classe II tornam-se mais susceptíveis à lise pelas NKs (STITES, D.P. e cols., 1997).

Células NK são uma subpopulação distinta de linfócitos que, sem sensibilização prévia e sem necessidade de restrição ao MHC podem destruir células tumorais e células normais infectadas por vírus. O mecanismo pelo qual as células NK preferencialmente reconhecem e lisam alvos transformados, em vez de normais, não é bem claro. Tem sido reportado que células tumorais que falham na expressão de pelo menos um alelo da classe I do MHC são mais efetivamente atacadas pelas células NK (SCHREIBER, H., 1999).

Todas as células nucleadas expressam moléculas MHC I em sua superfície. O propósito básico do MHC I é apresentar antígenos peptídicos endógenos (próprios) em uma superfície celular. Quando um antígeno peptídico invasor tal qual o antígeno tumor-específico é apresentado pelo complexo de superfície MHC I, células T citolíticas reativas ao antígeno podem reconhecer o peptídeo estranho com seus receptores para célula T e matar a célula. Outra função dos receptores MHC I é inibir a tendência inata das células NK a se ligarem e matarem as células (TRINCHIERI, G., 1989).

Os tumores podem tentar evitar a imunovigilância através do comprometimento da regulação da expressão do MHC I evitando portanto, o reconhecimento das células T. Contudo, devido ao fato da expressão de MHC I ser necessária para inibir a função "*killer*" natural, as células tumorais que subregulam a expressão do MHC I tornam a si próprios como alvos ao ataque da célula "*killer*" natural (NAYLOR, M.E., 2000). Portanto, células NK podem representar uma defesa inicial do hospedeiro contra o crescimento de células transformadas nos sítios primários e metastáticos, como um mecanismo efetor recrutado pelas células T para suplementar a resposta anti-tumoral específica (SCHREIBER, H., 1999). Além da ação anti-tumor, via MHC, tem sido reportado que monócitos, e principalmente as células NK, são importantes células efetoras

na morte de células tumorais pela citotoxicidade mediada por células dependentes de anticorpos (ADCC) *in vitro* (ABDULLAH et al., 1999).

2.2.2.2- Macrófagos

Os macrófagos são importantes na imunidade contra tumores como células apresentadoras de antígenos e como células efetoras potenciais para mediar a lise do tumor. Além destas funções, está claramente demonstrado que monócitos e macrófagos de um indivíduo normal podem ter reatividade espontânea contra células tumorais após ativação (QUEIRÓZ, S.L. & BATISTA, A.A., 1999). Esta atividade é independente do reconhecimento de antígenos tumorais. A atividade anti-tumoral natural macrofágica é pequena, mas aumenta muito após ativação por linfocinas, principalmente IFN γ , endotoxinas ou outras substâncias que induzem várias transformações bioquímicas e morfológicas nos macrófagos (LEENEN, P.J.M., et al, 1994).

Os achados de Li, C. e cols (2002) demonstraram que Macrófagos Associados a Tumores (TAMs) possuem tanto efeitos positivos quanto negativos no crescimento de tumores em vários tipos de câncer. Os macrófagos, de maneira geral, têm numerosas funções relacionadas à imunidade, inflamação e remodelamento tecidual. Os macrófagos associados aos tumores (TAM) representam um componente importante do infiltrado mononuclear peritumoral. Estas células, quando localizadas no micro-ambiente do tumor, têm a capacidade de agir sobre o tecido neoplásico favorecendo ou dificultando o crescimento das células tumorais, sua vascularização e a formação e dissolução do estroma. Ainda, quando ativados adequadamente, os TAM são capazes de matar as células tumorais ou de promover sua destruição por alterar sua vascularização (KURASHIGE, S. & MITSUHASHI, S., 1982).

Macrófagos residuais não são citolíticos para tumores, mas podem se tornar quando ativados com Fatores Ativadores de Macrófagos (MAF), normalmente secretados pelas células T após estimulação antígeno-específica. Dentre os MAF liberados pelos linfócitos T temos IFN γ , TNF, IL-4 e GM-CSF (RESTIFO, N.P. et al, 1993). Os mecanismos de lise mediados por MAF envolvem transferência intercelular de produtos lisossomais, produção de superóxidos, liberação de proteinases neutras e secreção de TNF. (NATHAN, C. & SHILOH, M.U., 2000; BOGDAN, C., 2001).

2.2.3- Mecanismos de escape do tumor

Apesar de ser possível evidenciar antígenos tumorais e mecanismos efetores de destruição, a célula tumoral consegue crescer e o tumor desenvolver-se. Esta observação, aparentemente paradoxal, deve-se a vários mecanismos de escape dependentes da célula tumoral ou de particularidades do sistema imune (JANEWAY, C.A. et al, 2002).

2.2.3.1- Expressão antigênica

Como já foi salientado anteriormente, a célula tumoral não expressa necessariamente novos antígenos. Os antígenos normalmente presentes podem estar ausentes ou com expressão alterada. Desta forma, alguma mudança nas moléculas de classe I do MHC impossibilita o reconhecimento da célula tumoral pelas células T citotóxicas (URBAN, J.L. & SCHREIBER, H., 1992). Exemplos desta situação foram observados em pelo menos dois linfomas de Burkitt europeus dos quais se desenvolveram linhagens celulares em que não se detectam antígenos HLA A e B (linhagens DAUDI e CHEV) (FARIAS, M.G. & CASTRO, S.M., 2004).

Um antígeno tumoral imunogênico, e apresentado ao sistema imune dentro do indispensável contexto do MHC, desencadeará uma resposta. No entanto, este antígeno pode estar heterogeneamente expresso, permitindo às células tumorais, que não o expressam, uma fuga. Estruturas da superfície celular podem estar mascaradas por um excesso de mucina, açúcares e ácido siálico adicionados aos antígenos impedindo o reconhecimento pelo sistema imune. Alguns tumores secretam grandes quantidades de antígenos na circulação. Os anticorpos produzidos formam complexos imunes circulantes e não conseguem chegar ao alvo celular tumoral (OLIVEIRA, E.A. & SELL, A.M., 2002).

2.2.3.2- Tolerância e Supressão

A presença de antígenos tumorais e complexos imunes circulantes pode induzir imunossupressão com conseqüente diminuição da resposta antitumoral (SALGUEIRO, M.I.C.P., et al, 2000). Em modelos experimentais, foi demonstrado o aparecimento de células supressoras e seus fatores após imunização em condições particulares. Observações feitas em camundongos com a inoculação de tumores de diferentes tamanhos mostram que existem situações em que um pequeno número de células desenvolve-se progressivamente enquanto um grande número de células implantadas excita o sistema imune e o tumor é rapidamente rejeitado. Produtos tumorais podem agir negativamente e diretamente no sistema imune como no caso da secreção de prostaglandinas que inibem a ação de macrófagos e células NK (BUCHI, D.F., 2002).

2.2.3.3- Facilitação

Em modelos experimentais, o transplante de tumor alogênico leva normalmente à rejeição devido a dois tipos de antígenos: de histocompatibilidade e ATAT (Antígenos de Transplante Associados a Tumores). Um efeito paradoxal, no entanto, é observado em certas condições quando a pré-imunização produz anticorpos que, em vez de levarem à rápida rejeição, aumentam o crescimento tumoral ou facilitam este crescimento (em inglês: "*enhancement*") (RODALLEC, M. et al, 2006).

Pelo menos dois mecanismos, um envolvendo o reconhecimento, outro a via efetora do sistema, formam propostas para explicar o fenômeno: no primeiro caso, os anticorpos se combinariam com antígenos tumorais, impedindo o reconhecimento pelos linfócitos; e no segundo, os anticorpos impediriam as células citotóxicas de desempenharem suas funções que necessitam interação celular através do antígeno (ILLMAN, R.O., 1994). Evidentemente não é qualquer anticorpo que pode exercer estas funções e a classe e subclasse da imunoglobulina são importantes. Embora não se saiba com certeza qual o papel dos anticorpos facilitadores em sistemas naturais, é bem possível que tal tipo de anticorpo exista como mecanismo de escape imunológico de tumores (MARIA, D.A., 2002).

2.3- A Pele

Corresponde ao maior órgão do corpo humano, medindo 1,5 – 1,8m², cobrindo toda a superfície do corpo e representando 16% do peso corpóreo total (MURPHY, M.I.H.M., 1996). Na pele observam-se várias estruturas anexas, tais como pêlos, unhas, glândulas sudoríparas e sebáceas (BOROJEVIC, R. & SERRICELLA, P., 2002). Existem dois principais tipos de pele: a pele fina, composta por uma delgada camada epitelial queratinizada, pêlos, glândulas sebáceas e sudoríparas; e a pele espessa, composta por larga camada epitelial queratinizada, revestindo a palma das mãos e a planta dos pés, apresentando glândulas sudoríparas, mas não sebáceas ou pêlos (GLERAN, A., 2002; BOROJEVIC, R. & SERRICELLA, P., 2002).

Histologicamente, o tecido cutâneo é constituído por três camadas principais: a epiderme, a derme e a hipoderme. A primeira camada, a epiderme, é uma porção epitelial constituída por epitélio pavimentoso estratificado queratinizado (MURPHY, M.I.H.M., 1996). Essa camada é constituída por grande quantidade de proteínas tipo queratina. A epiderme é subdividida nas camadas córnea, granulosa, espinhosa e basal (JUNQUEIRA, L.C. & CARNEIRO, J., 1999). A epiderme apresenta ainda vários tipos celulares epiteliais interdependentes, os queratinócitos (produtores de queratina), os melanócitos (produtores de melanina), as células de Merkel (receptores mecânicos) e as células de Langerhans (apresentadoras de antígenos) (GLERAN, A., 2002).

A segunda camada da pele, a derme, é uma porção conjuntiva de origem mesodérmica, que se divide em superficial e profunda (BRASILEIRO FILHO, G., 1998). A terceira camada, a hipoderme ou tecido subcutâneo profundo, é a última camada histológica da pele. Esta camada tem função de colaborar na termorregulação corporal e manutenção constante da temperatura fisiológica do corpo por volta de 37°C (JUNQUEIRA, L.C. & CARNEIRO, J., 1999).

2.3.1- Organização do tecido linfóide cutâneo

A pele é a principal barreira entre os tecidos internos e o meio externo juntamente com as mucosas. É um sistema efetor de defesa, pois pode gerar e suportar reações inflamatórias e imunológicas locais. Trata-se de tecido linfóide organizado e altamente especializado localmente, tanto na derme quanto na epiderme. Este tecido representa cerca de 2% dos linfócitos T CD8⁺ intraepidérmicos e 98% dos linfócitos T CD4⁺ (ROBBINS, P.F. & KAWAKAMI, Y., 1996). A circulação desta população linfóide é controlada por moléculas de adesão do tipo CLA-1 (E-selectina), rica em ácido siálico, expressa após ativação local. Os queratinócitos e as células epiteliais, após ativação, produzem várias citocinas como IL-1(interleucina 1), TNF (Fator de Necrose Tumoral), IL-3 (Interleucina-3), GM-CSF (Fator Estimulador de Colônias do tipo Granulócito-Monócito), que estimulam a quimiotaxia e ativação de leucócitos. Expressam ainda moléculas de classe II do complexo principal de histocompatibilidade (MHC), após ativação pelo Interferon gama (IFN γ) (SCHREIBER, H., 1999).

Na epiderme se encontram também as células de Langerhans, derivadas da medula óssea, que são apresentadoras de antígenos (APC) protéicos aos linfócitos presentes na derme. Após o processamento dos antígenos, essas células migram para os órgãos linfóides regionais (áreas interfoliculares) onde são identificadas como células dendríticas interdigitantes. São encontrados também macrófagos dispersos e linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ preferencialmente ao redor dos vasos sanguíneos. Geralmente apresentam um perfil de marcadores de ativação ou de memória, como o CD45 (fosfotirosina fosfatase) e o CD25 (receptor alfa da IL-2). Linfócitos B, produtores de imunoglobulinas, são raramente encontrados na pele normal. A resposta imune humoral na pele é representada por imunoglobulinas do tipo IgA secretoras e fazem parte das secreções glandulares da pele. Entretanto, como os linfócitos B são raros nos tecidos cutâneos, as imunoglobulinas devem ser produzidas no linfonodo regional e transportadas até a pele (MARIA, D.A., 2002).

2.3.2- As neoplasias da pele

O câncer de pele é a neoplasia mais comum entre os humanos. Estudos descritivos mostram que as taxas de incidência dos principais tipos de câncer de pele: o Carcinoma Basocelular (CBC), o Carcinoma Escamoso e o Melanoma, são máximas em populações nas quais a exposição ambiental ao sol e a radiação solar na pele são altas, sugerindo uma forte associação com esta exposição (GREEN, A., et al, 1999; HERRERA, E. e cols, 1999). Para fins práticos, o câncer de pele é dividido em dois grandes grupos: o câncer não melanoma (Carcinoma Basocelular e o Carcinoma Escamoso) e o Melanoma (VIDRIO, R.M.G., 2003).

Mutações em importantes genes supressores de tumor, segundo estudos epidemiológicos e genéticos, são causadas por exposição solar. Apesar dos constantes estudos, muitas questões ainda permanecem sem respostas elucidativas. Elas incluem o quanto o padrão de exposição solar é realmente importante e se atua independentemente da quantidade de exposição ao sol, qual a relação entre quantidade de exposição e o risco de desenvolver um ou outro tipo de câncer de pele e o quanto a relação exposição-resposta depende da sensibilidade cutânea ao sol (ARMSTRONG, BK, et al, 1997).

Muitos trabalhos confirmam que a exposição ao componente UV do sol é o principal determinante ambiental dos cânceres de pele. Entretanto, alguns resultados com carcinoma basocelular e melanoma são discordantes pela existência de subgrupos destas doenças as quais não parecem ser causadas apenas pela exposição solar (WHITAKER, D., 1997; GREEN, A., et al, 1999).

2.4- O Carcinoma Basocelular (CBC)

2.4.1- Epidemiologia

O câncer de pele não melanoma é o mais incidente em homens em todas as regiões do Brasil e nas mulheres é o mais freqüente nas regiões Sul Centro-Oeste, Nordeste e Norte (INCA, 2006).

2.4.2- Etiologia e Genética Molecular

A etiologia do CBC ainda é desconhecida, entretanto, evidências sugerem que o CBC origina-se de células pluripotentes na camada basal ou folículos da pele. (LACOUR, J.P., 2002; JIANG, S.B. & SZYFELBEIN, K., 2005). Mutações no gene PATCHED (PTCH), um regulador negativo da via Hedgehog, localizado no cromossomo 9, parece ser o responsável pelo crescimento de tumor na Síndrome de Nevus Baso-Celular (BCNS), uma condição autossômica caracterizada por múltiplos CBCs (VILLAVICENCIO, E.H. e cols., 2000 e TAIPALE, J. & BECHY, P.A., 2001). Esta via de sinalização parece ser muito importante para o desenvolvimento do CBC (SALDANHA, G., 2001 e BALE, A.E. & YU, K., 2001). Patched Humano (PTCH) é uma proteína transmembrana da via de sinalização Hedgehog, que tem um papel importante no desenvolvimento embrionário e no câncer. Mutações que levam à inativação do gene PTCH têm sido identificadas em neoplasias esporádicas ou hereditárias como carcinomas basocelulares. (LINGL, G. e cols, 2003; JIANG, S.B. & SZYFELBEIN, K., 2005 MARTINEZ, M.A.R., e cols, 2006).

2.4.3- Carcinogênese do CBC

O câncer é uma enfermidade genética e durante sua formação a célula neoplásica acumula uma série de mutações em seu genoma, inativa genes supressores tumorais, modifica o ciclo celular, alterando as funções normais da célula e seu fenótipo. A célula cancerígena é anômala, cresce e prolifera descontroladamente devido à perda de suas funções e diferenciação fenotípica; inibe as vias apoptóticas, promove escape imunológico, estimula a angiogênese, podendo invadir tecidos vizinhos ou à distância (PONDER, B.A., 2001 e LIOTTA, D.J. & KOHN, E.C., 2001). A carcinogênese do CBC é um processo complexo que tem sido motivo de múltiplos estudos nos últimos anos. A maioria dos CBCs compartilham as mesmas alterações genéticas, porém variações na expressão de determinados genes e proteínas são a base genética dos diferentes padrões clínicos e histológicos do CBC (TSAO, H., 2001).

Como é que as agressões ambientais, químicas, físicas e biológicas causam danos às nossas células? Uma grande parte de conhecidos agentes carcinogênicos sofre uma bio-transformação para compostos que são convertidos em metabólitos não-tóxicos que podem ser excretados facilmente pelo organismo humano. A eficácia das vias metabólicas que atuam neste processo de detoxificação pode, portanto, determinar o dano inicial causado por um determinado carcinógeno ao DNA e, subseqüentemente, o risco de desenvolvimento de neoplasia (WARD, L.S., 2002).

No início do século XX, quando os raios UV se tornavam reconhecidos como forma terapêutica eficaz para algumas doenças de pele, começaram a surgir relatos dos efeitos nocivos da luz solar, como desencadeante de algumas doenças, como xeroderma pigmentoso, hidroa vaciniforme, prurigo estival e alguns tipos de câncer de pele. Paul German Unna foi o primeiro dermatologista que associou a exposição solar prolongada com aparecimento de lesões na pele de marinheiros (DUARTE, I. et al, 2006).

Sabe-se hoje que apenas cerca de 1% de todos os tipos de cânceres são de origem hereditária ou de natureza constitucional (NISHIMORI, et al, 2001; INCA, 2006). A grande maioria dos cânceres é originada por fatores ambientais que podem ser representados pelos agentes químicos oriundos do tabagismo e do alcoolismo, de infecções parasitárias e virais, hábitos sexuais, medicamentos e dieta alimentar inadequada. Com relação às neoplasias cutâneas, o grande vilão são os fatores físicos, representados principalmente pelos raios ultravioleta (UV) do sol (UVA, UVB e UVC) (HELFAND, M., 2001; WARD, L.S., 2002; NUNES, L.O., 2003).

A radiação ultravioleta é um carcinógeno completo que inicia o processo de malignização por meio de mutações no DNA e promove o desenvolvimento do câncer por processo inflamatório inerente à exposição UV cumulativa (HORA, C. et al, 2003). Quando o processo neoplásico se instala, a célula-mãe transmite às células filhas a característica neoplásica. Isso quer dizer que, no início de todo o processo está uma alteração no DNA de uma célula (WARD, L.S., 2002).

Segundo Robenhorst, S.H. e cols (1993), o antígeno Ki-67 é uma proteína nuclear expressa nas células em proliferação durante as fases G_1 , S, G_2 e M, mas não em células na fase G_0 do ciclo celular, em função da perda deste antígeno. É desconhecida a função do antígeno Ki-67, mas acredita-se que está relacionado com fatores de transcrição. Campbel, C. e cols (1993) sugerem que quando uma alteração é produzida no genoma, a proteína p53 (codificada por um gene supressor de tumor que regula o ciclo celular) ativa um mecanismo que detém o ciclo celular, permitindo o reparo da alteração, antes da fase S. Caso a alteração seja irreversível, a p53 ativa uma via indutora de apoptose celular. Quando um alelo do gene p53 está mutado, o gene não se expressa corretamente e a célula torna-se mais resistente à apoptose. Caso ambos os alelos da p53 estejam mutados, a célula é incapaz de regular seu ciclo celular, não repara bem o DNA nem entra em apoptose quando as alterações são

graves, o que favorece a carcinogênese (BOONCHAI, W. et al, 2000; AUEPEMKIATE, S. et al, 2002; DE ROMAÑA, F.N. e cols, 2002).

2.4.4- Biologia do CBC

A pele responde à exposição solar com o escurecimento e o endurecimento, que promovem alguma proteção contra danos causados pela radiação UV. O grau de pigmentação da pele e a capacidade de escurecer são fatores importantes no risco de desenvolvimento de câncer de pele (GLOSTER, H.M. & BRODLAND, D.G., 1996).

A radiação UV promove tumorigênese por dois mecanismos, o primeiro promove proliferação celular prolongada, aumentando a vida-média dos erros de transcrição, o que pode levar à transformação celular; o segundo mecanismo ocorre por dano direto na replicação do DNA, levando a mutações que podem ativar proto-oncogenes ou desativar genes supressores de tumor (BANDEIRA, A.M. e cols., 2003). As células possuem mecanismos para conter este dano antes que o câncer possa se desenvolver, incluindo reparo do DNA, apoptose e sobrevivência imune. A radiação pode danificar as células da pele pela formação de dímeros no DNA, entre os resíduos adjacentes de pirimidina, levando a mutações que se acumulam ao longo do tempo (ANANTHASWAMY, HN, et al, 1997).

A célula pode responder ao dano causado pela radiação UV através do reparo do DNA contra mutações perigosas ou, se o dano for muito grande, pela indução de apoptose para remover potenciais neoplasias da população (TORNALETTI, S. & PFEIFER, GP, 1996; COTTON, J. & SPANAU, DF, 1997). Possíveis falhas nestas vias podem resultar na perda do controle da proliferação celular e permitir o desenvolvimento de um tumor de pele através da depressão da inativação de genes supressores de tumor ou da ativação de oncogenes. A importância dos mecanismos de reparo do DNA na prevenção do câncer de pele é comprovada pela alta incidência deste tipo de câncer em pacientes que

possuem doenças que afetam este processo, como o *Xeroderma Pigmentosum* (CLEAVER, JE. & KRAEMER, KH, 1989).

Uma explicação interessante acerca da patogênese do CBC pode ser vista no trabalho de Vidrio, R.M.G. (2003), onde este explica que a radiação UV favorece mecanismos imunológicos supressores sobre os colaboradores, alterando a função de apresentação de antígenos nas células de Langerhans, permitindo o fluxo de células inflamatórias. Além disso, ocorre isomerização do ácido urocânico e produção de TNF α e IL-10 pelos queratinócitos. Este evento promove o desenvolvimento de células Th2 e inibição de células Th1, resultando na supressão da resposta de hipersensibilidade por contato.

A sobrevivência imune também tem um importante papel na proteção contra o desenvolvimento do câncer de pele. A exposição UV atua deprimindo a função do sistema imune na pele, criando um ambiente mais favorável para o desenvolvimento e crescimento de tumores (KRIPKE, M.L., 1981). Os mecanismos imunes que atuam no tumor são locais e sistêmicos. A resposta local é análoga à hipersensibilidade tipo tardia, com reconhecimento de antígenos tumorais e uma subsequente resposta mediada por célula (GRIMWOOD, R.E., 1989).

2.4.5- Morfologia do CBC

As células tumorais têm núcleo grande, oval ou alongado com citoplasma relativamente pequeno. Estas células podem assemelhar-se às células basais da epiderme, mas na forma neoplásica faltam pontes intercelulares. Estão dispostas em ninhos, cordões e ilhas na derme. As mitoses não são freqüentes. Pode ocorrer queratinização, deposição de melanina, necrose e degeneração mucinosa (ROSAI, J., 2004).

Histologicamente as células deste tipo de tumor assemelham-se às da camada basal da epiderme. Estas células provêm da própria epiderme ou do

epitélio folicular, sendo mais raras em superfícies mucosas. Dois padrões são freqüentemente observados: o crescimento multifocal e o nodular, este quase sempre envolvido por fibroblastos e linfócitos. (ROBBINS, S.L., et al, 1994).

Os padrões histológicos de apresentação do CBC variam de acordo com a classificação utilizada. Segundo Lever, W.F. (1990), podem-se evidenciar os seguintes padrões: o Adenóide, onde se observam formações tubulares e estruturas tipo glândulas, com as células dispostas radialmente ao longo de "ilhas" de tecido conectivo; o Morfea, onde há uma grande participação de tecido conectivo e as células encontram-se embebidas num denso estroma fibroso; o Cístico, que mostra espaços císticos no centro das massas tumorais; o Sólido ou Circunscrito, que mostra massas tumorais de tamanhos variados embebidas na derme; o Superficial, que apresenta proliferações irregulares de tecido tumoral ligadas à superfície da epiderme; e o Folicular, que evidencia cada folículo piloso distorcido pela proliferação de "ilhas" de células basais que se estendem por baixo da epiderme.

O CBC geralmente tem crescimento lento. Entretanto, quando não tratado, o tumor pode invadir a gordura subcutânea, músculo esquelético e osso. Os tumores de face invadem fossas nasais, órbitas e osso temporal através do canal auditivo, podendo até invadir o SNC produzindo uma meningite letal. Metástases distantes são extraordinariamente raras, porém mais de 100 casos já foram descritos na literatura e cerca de 60 a 75% das metástases envolveram linfonodos regionais ou órgãos como pulmões, ossos e fígado (ROSAI, J., 2004).

2.5- Resposta Imunológica em tumores cutâneos

O simples agrupamento homogêneo de células mutantes não caracteriza os estágios iniciais do desenvolvimento de tumores; estas células desenvolvem-se ao acaso com outras do tecido normal e também recrutam outros tipos celulares, incluindo células linfáticas e endoteliais, necessárias para o desenvolvimento do suprimento sanguíneo do tumor (VOLTARELLI, J.C., 1994; OWEN, M.R. & SHERRATT, J.Á.; 1998). A formação de tumores e as reações inflamatórias são duas diferentes condições patológicas com distintas etiologias de iniciação, mas apresentando mecanismos de desenvolvimento que dividem características básicas. (DIMITRIADOU, V. & KOUTSILIERIS, M., 1997).

Os Polimorfonucleares são os leucócitos mais abundantes na circulação sanguínea e representam a primeira linha de defesa contra infecções, uma das principais reações cutâneas locais. Durante as respostas inflamatórias, liberam fatores quimiotáticos solúveis responsáveis pelo recrutamento de células efectoras não específicas e imuno-específicas. No processo inflamatório, os mesmos produzem citocinas que modulam o balanço entre a imunidade humoral e a mediada por células (JANEWAY, C.A. et al, 2002).

O processo quimiotático exercido pelos polimorfonucleares neutrófilos, através da circulação sanguínea para o tumor, é regulado por múltiplas etapas envolvendo uma série de interações celulares coordenadas entre leucócitos e células endoteliais. Algumas famílias de moléculas regulatórias como as selectinas P(GMP-140), E (ELAM-1) e L (LAM-1), integrinas b2 e citocinas estão envolvidas nessas etapas. Vários mediadores citotóxicos são produzidos e liberados, como as espécies reativas do oxigênio e nitrogênio, proteases, agentes perfurantes da membrana e mediadores solúveis da morte celular como o TNF α , IL-1 e IFN (STITES, D.P., et al, 1997; BRASILEIRO FILHO, G., 1998).

A eliminação específica das células tumorais pelos neutrófilos e macrófagos pode ser mediada pela liberação de seu conteúdo enzimático, ou por oxidantes do tipo ácido hipocloroso, que lisam células tumorais ou por reativos intermediários como cloraminas estáveis que apresentam propriedades imunoestimulatórias. Os fenômenos biológicos atualmente desempenhados pelos polimorfonucleares nas respostas anti-tumorais são devidos à modulação da atividade citotóxica mediada por células dependente de anticorpos (ADCC) ou ainda pela indução da morte celular programada (apoptose) devido à interação entre Fas- FasL na superfície da celular tumoral. Dados clínicos têm mostrado que os tratamentos com GM-CSF e G-CSF (Fator Estimulador de Colônia Granulocítica) em pacientes portadores de melanoma estimulam a atividade ADCC, cujas células efectoras são os granulócitos (SCHREIBER, H., 1999).

Muitos antígenos tumorais têm sido identificados nas diferentes etapas da diferenciação e crescimento das neoplasias cutâneas. Em neoplasias cutâneas estes antígenos representam grupos comuns de diferenciação tecido-específico. As respostas mais comuns são dirigidas não aos antígenos tumorais específicos, mas sim aos antígenos de diferenciação tecido-específico (STITES, D.P., 1997; WAINSTEIN, A.J.A. & BELFORT, F.A., 2004; RODALLEC, M. et al, 2006).

2.6- Os mastócitos da pele

Os mastócitos derivam de células precursoras mononucleares, as quais entram em sua fase final de diferenciação nos tecidos. Na pele normal, os mastócitos ocorrem em grande densidade na zona dermal superficial (CHURCH, M.K., et al, 1991). Semelhante a todos os outros mastócitos, os da pele humana se ligam à IgE com alta afinidade através de receptores específicos FcεRI, mas, diferentemente dos mastócitos do pulmão, amídalas, adenóides e intestino, eles expressam o receptor C5a (CD88) e sítios de ativação para a substância P, VIP, somatostatina e o componente 48/80 (estimulação não-imunológica) (METCALFE, D.D. e cols, 1997). Ambos são dependentes de IgE, para a estimulação através da ativação de tirosina-quinases e, na estimulação por componentes não-imunológicos, ocorre a ativação de proteínas-G (CHURCH, M.K. & CLOUGH, G.F., 1999).

A resposta à estimulação do mastócito é a ativação celular e conseqüente liberação de mediadores pré-formados. O mecanismo de liberação do mediador, em resposta ao estímulo dependente de IgE e ao estímulo não-imunológico são distintos. Entretanto, as características morfológicas da degranulação são similares, sugerindo que as distintas vias bioquímicas convergem para uma via comum antes da degranulação efetiva (BENYON, R.C., 1989).

2.6.1- Os mastócitos e as neoplasias

A associação entre mastócitos e tumores já é conhecida há muito tempo. Em 1879, P. Ehrlich observou pela primeira vez estas células próximas às áreas de tumor e, em 1890, E. Westphal mencionou em sua tese de doutorado que mastócitos se acumulavam em grande número especialmente nos tumores mais antigos (SHARDENDORF, D. e cols, 1995). Desde então, muitos autores confirmaram estas observações originais em uma variedade de tumores e espécies. Em geral, o número de mastócitos ao longo da junção tumor-

hospedeiro é significativamente maior do que aquele encontrado em tecidos normais, especialmente em neoplasias benignas, e apenas poucos são detectados nas trabéculas fibrovasculares dentro da massa tumoral (ROCHE, W.R., 1986).

Um estudo realizado com carcinoma basocelular e escamoso demonstrou que nas áreas de tumor pode-se evidenciar a presença predominante de linfócitos TCD4⁺, macrófagos, granulócitos e mastócitos, estes ativados e em degranulação tanto no próprio tumor, quanto no estroma adjacente (CLAUDATUS, J.C. Jr e cols, 1986).

Para o entendimento do papel do acúmulo de mastócitos em zonas peritumorais, foram propostas duas hipóteses; a primeira, relaciona-se a uma reação imunológica de defesa do hospedeiro, onde a presença de mastócitos em tumores antigos é interpretada como uma simples resposta imunológica anti-tumor (CSABA, G., e cols, 1961). A favor desta hipótese existem estudos que demonstram que mastócitos e basófilos, bem como seus produtos de degranulação, possuem um efeito protetor contra tumores (DVORAK, A.M., e cols, 1970; TANOOKA, H. e cols, 1982; YANG, M.L., 1989) ou são citotóxicos para tumores *in vitro*, principalmente aqueles sensíveis ao TNF α (ZAKUT, R. e cols, 1993; DIMITRIADOU, V. & KOUTSILIERIS, M., 1997).

Outros estudos como o de Zakut, R. e cols (1993) indicam que os mastócitos peritumorais teriam papel importante na imunidade anti-tumor, estimulando a proliferação de células T (Mekori, Y.A. & Metcalfe, D.D. 1999) e a produção de IgE pelas células B. Yang, M.L. (1989) sugere que a liberação de histamina e outros mediadores ativos estimulariam os fibroblastos a sintetizar colágeno, formando uma fina membrana entre o carcinoma e a derme, impedindo a disseminação tumoral. Estudos mais recentes como o de Theoharides, T.C. & Pio Conti (2004), evidenciam que, além das já citadas funções dos mastócitos peritumorais, estas células promoveriam atração

leucocitária (IL-8), inflamação (IL-1, -2, -3, -5, -6, -9, -10, -13, -16, IFN γ , TNF α) apoptose de células tumorais (IL-4 e TNF α) e vasoconstrição (PGD $_2$).

A segunda hipótese sugere que os mastócitos promoveriam o crescimento tumoral e a metástase. Este fenômeno estaria relacionado com alterações na matriz extracelular, migração celular e neovascularização (DABBOUS, M., e cols, 1986; FARNOUSH, A. & MCKENZIE, I.C., 1983; FOLKMAN, J., 1986). Muitos estudos têm mostrado associação entre mastócitos que se acumulam em áreas tumorais e o rápido crescimento dos tumores ou do estado de malignidade (ROCHE, W.M., 1986; 1986; DABBOUS, M. e cols, 1991; GRIMBALDESTON, M.A. e cols, 2000; ERKILIC, S. & ERBAGCI, Z., 2001). Por exemplo, na maioria dos carcinomas de mama e cervicais, a degranulação de mastócitos foi acompanhada de metacromasia do estroma, um marcador clássico da atividade secretória do mastócito (HARTVEIT, F., 1981).

Alguns dados clínicos indicam que os mastócitos, quando ativados, liberam substâncias que promovem o crescimento do tumor e sugerem que mais de 50% da massa tumoral é resultante da interação com estas células (ROCHE, W., 1986). Estudos *in vitro* mostraram que os produtos solúveis dos mastócitos são capazes de aumentar a taxa proliferativa de células tumorais (BURTIN, C., e cols, 1985). Estas observações foram apoiadas por modelos *in vivo* de adenocarcinoma mamário de ratos, mostrando que a supressão farmacológica da atividade do mastócito resultou numa significativa redução do crescimento do tumor (DABBOUS, M., e cols, 1991; DE CIDRE, L.L. e cols, 1996).

Uma outra corrente de investigadores, apesar de concordar com a correlação entre mastócitos e crescimento tumoral, atribui esta relação, não à atuação direta dos mastócitos, mas sim à atuação indireta do tumor ou ambas. Um estudo feito com camundongos BALBc revelou que a degranulação de mastócitos aumentou junto com o crescimento do tumor, enquanto que na derme e na hipoderme, esta degranulação primeiro diminuiu e só tornou-se

evidente no vigésimo dia. A mitose e a degranulação dos mastócitos, mais intensa nos tecidos próximos ao tumor, parece indicar a existência de fatores tumorais que se espalham lentamente do tumor para zonas mais distantes (DE CIDRE, L. & SACERDOTE DE LUSTIG, E., 1990).

Uma etapa elementar para o entendimento do papel dos mastócitos na gênese tumoral é explicar como estas células se acumulam nas áreas de tumor. Uma das hipóteses levantadas é que as células neoplásicas poderiam secretar fatores que induziriam a proliferação de mastócitos diferenciados ou alteração de progenitores para áreas de tumor, onde ali eles se diferenciariam e se multiplicariam (UEDA, T. e cols, 1988). Alguns estudos sugerem que células tumorais devem produzir fatores os quais induzem o crescimento do mastócito (NAKAMURA, K., et al, 1994). Outros mostram que a diferenciação de precursores de mastócitos humanos é determinada por fatores micro-ambientais como o *Stem Cell Factor* (SCF) (também chamado de c-kit ligante), secretado por fibroblastos e algumas linhagens de células tumorais humanas (TURNER, A., et al, 1992; HINES, S.J., et al, 1995).

Estudos mais recentes mostram que os mastócitos tumor-associados são reprogramados para induzir uma supressão imune das defesas *in situ* do hospedeiro, através da liberação de citocinas específicas, prostanóides e outros mediadores humorais. Esta resposta desordenada, resulta na inibição dos mecanismos imunes anti-câncer mediados por células. Simultaneamente, os mastócitos tumor-associados produzem fatores que promovem o crescimento do tumor. O somatório desta complexa rede de fatores biológicos resulta no progressivo crescimento do tumor e na disseminação das células tumorais (AL SARIREH, B. & EREMIN, O., 2000; GRIMBALDESTON, M.A., et al, 2000).

A presença de células do infiltrado inflamatório em áreas de tumores tem sido considerada um sinal de uma resposta imunológica anti-tumor no hospedeiro, mas a relação entre as populações celulares, que compõem este infiltrado, ainda não está bem estabelecida. Dados de um estudo feito com

carcinoma basocelular revelaram números elevados de mastócitos e linfócitos T nas áreas tumorais, indicando que estas células correspondem à população imune primária que responde a este tipo de tumor. Foi observado também, que a diminuição do número de células T estaria associada com tumores mais agressivos (DENG, J.S., et al, 1996).

Um estudo histológico realizado com 17 casos de carcinoma basocelular mostrou que o número de mastócitos foi elevado na derme próxima ao tumor. Existiu também um aumento das fibras de colágeno entre os tecidos do carcinoma e a derme, formando uma fina membrana ao redor do carcinoma. Estes achados sugerem que o antígeno associado ao carcinoma ative os linfócitos a produzirem certas citocinas que estimulam a proliferação e diferenciação de precursores de mastócitos. A histamina e outros mediadores ativos liberados estimulariam os fibroblastos a sintetizar fibras de colágeno que formariam uma fina membrana entre o carcinoma e a derme. Esta membrana então, teria um papel protetor contra a disseminação do tumor (YANG, ML., 1989).

Estudos mais recentes permanecem discordantes quanto ao papel dos mastócitos na estimulação ou inibição do desenvolvimento tumoral. Dados imunohistoquímicos de estudos realizados com carcinoma basocelular e melanomas confirmam o aumento na densidade de mastócitos nas áreas tumorais e ressaltam o papel anti-tumor destas células (DUNKAN, L.M., et al, 1998; HUMPHREYS, T.R., et al, 2000). Entretanto, um outro estudo sugere que o aumento da prevalência dermal de mastócitos seria um fator que predispõe ao desenvolvimento do carcinoma basocelular em humanos. Este estudo sugere ainda que a função dos mastócitos nos humanos, como nos camundongos, seria iniciar uma imunossupressão e talvez criar um ambiente permissivo para o desenvolvimento deste tipo de tumor (GRIMBALDESTON, MA., et al, 2000; 2006).

A importância dos mastócitos na homeostase, inflamação e sobrevivência tumoral é embasada por numerosos estudos e a associação destas células com várias neoplasias tem sido investigada ao longo do tempo. Apesar de existirem muitos trabalhos mostrando a inter-relação entre mastócitos e neoplasias e, mais particularmente, entre mastócitos e neoplasias da pele, o papel destas células, componentes do sistema imune, ainda necessita de estudos mais detalhados com diferentes populações. A função dos mastócitos nestas áreas tumorais ainda não está bem determinada e os resultados apresentam discordâncias. Ainda é desconhecida a atuação dos mastócitos como células componentes da resposta imune anti-tumor, exercendo um papel protetor contra o desenvolvimento do câncer, ou, como facilitadores da instalação do tumor através de uma imunossupressão.

O papel dos mecanismos de defesa do hospedeiro nas neoplasias é objeto de controvérsia. O CBC é frequentemente associado a um infiltrado mononuclear peritumoral, mas até hoje a função deste infiltrado, e seu possível papel no crescimento do tumor, ainda não foi estabelecido. Enquanto alguns investigadores não encontram correlação entre prognóstico do tumor e células do infiltrado inflamatório, outros mostram uma relação positiva ou negativa, conseqüentemente a significância funcional da presença destas células próximas às áreas tumorais ainda permanece obscura e especulativa.

Poucos são os relatados na literatura sobre estudos comparativos relacionando a incidência e a função dos mastócitos e das células do infiltrado inflamatório nos diversos subtipos de Carcinoma Basocelular. A investigação da atuação destas células e sua interação com os elementos do ambiente tecidual, serão de grande auxílio para o entendimento do papel das mesmas na saúde e na doença, enquanto que a caracterização do infiltrado inflamatório nas variantes histológicas do CBC poderia auxiliar o desenvolvimento de métodos terapêuticos mais direcionados a cada caso.

3- OBJETIVOS

3- OBJETIVOS

3.1- OBJETIVO GERAL

Quantificar os mastócitos e as células do infiltrado inflamatório, nos subtipos de Carcinoma Basocelular (CBC), buscando correlacionar com as diferentes apresentações histológicas do tumor.

3.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

4.1- Avaliar as características clínico-epidemiológico (idade, sexo e local da lesão) no carcinoma basocelular;

4.2- Identificar e quantificar os principais tipos de células do sistema imune que compõem o infiltrado inflamatório nos diferentes subtipos de carcinoma basocelular;

4.3- Correlacionar o número de mastócitos à agressividade do tumor;

4.4- Sugerir hipóteses sobre a possível contribuição dos mastócitos como supressores ou auxiliares do crescimento tumoral;

4- METODOLOGIA

4- METODOLOGIA

4.1- Amostras de tecido e análise histológica por microscopia:

Para o estudo clínico-epidemiológico retrospectivo, os dados foram retirados dos prontuários arquivados no Instituto de Patologia Cutânea (IPAC), entre os anos de 2000 e 2001, considerando sexo, idade e localização do tumor. Foram encontrados 71 casos de biópsias de pele com diagnóstico de Carcinoma Basocelular (CBC) não-recorrentes durante o período citado. Os blocos em parafina do tecido cutâneo foram seccionados com 5 μ m de espessura, colocados sobre as lâminas de vidro para posterior identificação do subtipo de CBC.

Os casos foram selecionados e revisados por dois patologistas independentes: Dr. Moysés Sadigursky e Dr. Aryon Barbosa, que confirmavam cada subtipo em consenso, segundo a classificação de Lever, W.F. (1991). Estes casos foram agrupados de acordo com o subtipo de CBC, mediante análise histológica, por microscopia, das lâminas coradas com a técnica de Hematoxilina-Eosina (HE). Como muitos casos de CBC podem apresentar mais de um padrão histológico, considerou-se o subtipo que constituía 50% ou mais da lesão.

A classificação de Lever, W.F. (1991) foi comparada com os dados de classificação do Royal College of Pathologists (2002), onde os subtipos são classificados de acordo com o padrão de crescimento, como tumores de baixo risco (Folicular, Circunscrito, Cístico e Adenóide) e de alto risco (Superficial, Infiltrativo e Morfea). Esta classificação, mais atualizada, estava de acordo com os achados de Lever (1991) e foi utilizada para determinar a correlação entre o padrão de crescimento e a agressividade tumoral.

4.2- Histoquímica: técnica do azul de toluidina

A técnica utilizada foi a descrita por Luna, L. (1968). As secções obtidas foram desparafinizadas em 2 banhos de xilol durante 10 minutos cada, desengorduradas em 2 banhos de álcool absoluto durante 10 minutos cada, hidratadas gradativamente passando por banhos de álcool a 70%, 50%, 30% (5 minutos cada banho) e água destilada. As Lâminas foram coradas por 1 hora, em estufa a 60°C, em azul de toluidina acidificada (pH 3,5), e lavadas em água corrente. Após este procedimento, as lâminas foram imersas por 30 segundos em solução aquosa de molibdato de sódio a 1%. O material foi então desidratado em concentrações crescentes de álcool até o álcool absoluto e xilol, sendo montado com Bálsamo do Canadá.

4.3- Imuno-histoquímica:

As reações imunohistoquímicas foram realizadas nos cortes com neoplasia, pela técnica de complexo estreptavidina-biotina-peroxidase (StreptABC, DAKO®) (ANEXO 1). Resumidamente, as lâminas foram previamente revestidas por solução de silano (APTS - Sigma® A3648) diluído a 4% em acetona. Os cortes obtidos foram de 5µm de espessura após microtomia mecânica. Os cortes foram desparafinizados e preparados por passagens sucessivas por xilol e etanol e submetidos à recuperação antigênica pelo calor em banho-maria a 90°C, utilizando-se tampão citrato 10mM pH 6.0 por 20 minutos. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com solução de peróxido de hidrogênio a 3%, seguida da incubação com os anticorpos primários CD3, CD4, CD8, CD20, CD68, Ki-67 e MAST cell (Quadro 1). As reações foram reveladas com solução de Diaminobenzidina (DAB, Sigma®) a 60mg% e contra-coradas com hematoxilina de Harris (Merck®).

Quadro 1: Especificações dos anticorpos usados na imunohistoquímica

Produto	Clone	Especificidade	Diluição	Fonte	Ref.
CD68 mouse anti-human	PG-M1 Monoclonal	Macrófago	1:50	DAKO	M0876
CD3 rabbit anti-human	Policlonal	Linfócitos T	Pronto uso	DAKO	N1580
CD20 mouse anti-human	L26 Monoclonal	Linfócitos B	1:100	DAKO	M0755
CD8 mouse anti-human	C8/144B Monoclonal	Linfócitos T CD8 ⁺	1:50	DAKO	M7103
CD4 mouse anti-human	1F6 Monoclonal	Linfócitos T CD4 ⁺	1:25	NOVOCASTA	NCL-CD4-1F6
Ki-67 mouse anti-human	Ki-S5 (MIB) Monoclonal	Proliferação celular	1:10	DAKO	M7187
Mast cell Tryptase	AA1 Monoclonal	Mastócitos	1:50	DAKO	M7052

As secções foram lavadas em PBS-Tween (2x) e incubadas com o cromógeno Diaminobenzidina (DAB, Sigma®) a 60mg% por 2min ou (100µl/lâmina), lavadas em PBS-Tween e em água corrente e contracoradas com hematoxilina de Harris (Merck®) por 1-3min, sendo a seguir, desidratadas em álcool (2x), clarificadas com xilol (2x) e montadas com bálsamo do Canadá. Para o controle positivo externo das imunohistoquímicas utilizou-se amígdala hipertrófica.

4.4- Quantificação

As células foram quantificadas por µm² de tecido cutâneo, através do Analisador de Imagens LEICA QWIN 3.1 (Leica Microsystems – Leica Cambridge – UK). As células marcadas foram consideradas positivas quando apresentavam a imunocoloração homogênea e intensa. Foi determinado o número de células em três campos de 236.796 µm², totalizando uma área de 710.388 µm² para cada anticorpo testado, em cada paciente.

4.5- Análise estatística:

Os dados obtidos referentes à quantificação de células foram analisados estatisticamente através do software GraphPad Prism 4. Foram realizados testes de análise de variância (One-Way ANOVA), bem como testes não paramétricos de Newman-Keuls e Turkey's, para a comparação entre os grupos e dentro de cada grupo testado, utilizando-se, nas decisões de todos os testes estatísticos, o valor de significância de 5%.

5- RESULTADOS

5- RESULTADOS

5.1- Clínico- epidemiológicos

Dos 71 casos estudados, o sexo feminino contribuiu com 30% e o masculino com 70% do total de casos analisados (Figura 1). Quanto à idade dos pacientes, houve variação entre 17 e 84 anos, com predominância entre 60 e 71 anos e média das idades de 56,9 anos. O local mais freqüente das lesões foi a face (32%) (Figura 2).

TABELA 1: Dados epidemiológicos primários dos pacientes segundo padrão histológico do CBC (Lever,1991)

Tipos Histológicos	n absoluto	n relativo (%)	Homens	Mulheres	Local mais freqüente	Média/ Idade
Circunscrito	10	14,1	8	2	Fronte (4)	50,8
Infiltrativo	20	28,2	9	11	Face (6)	55,7
Superficial	18	25,3	6	12	Nariz (4)	58,7
Adenóide	10	14,1	7	3	Face (4)	54,7
Folicular	3	4,2	0	3	Face (2)	72,3
Cístico	4	5,6	2	2	Face (2)	72,2
Morfea	6	8,5	5	1	Braço(2) e Face (2)	51,0
					X	56,9
					SD	14,2

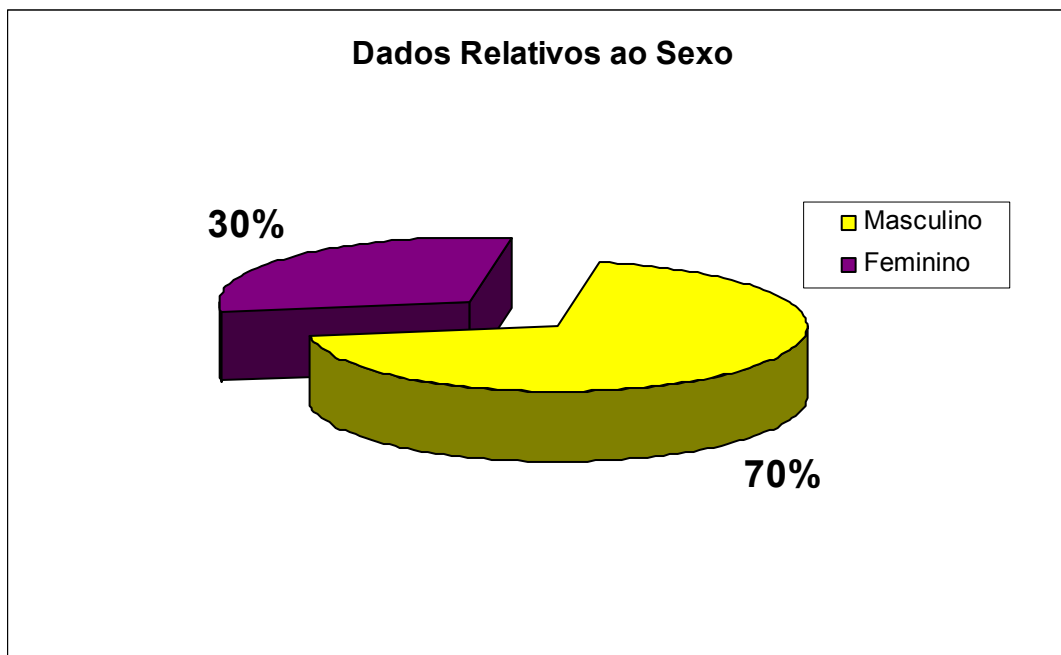


FIGURA 1: Distribuição relativa dos casos pesquisados quanto ao sexo.

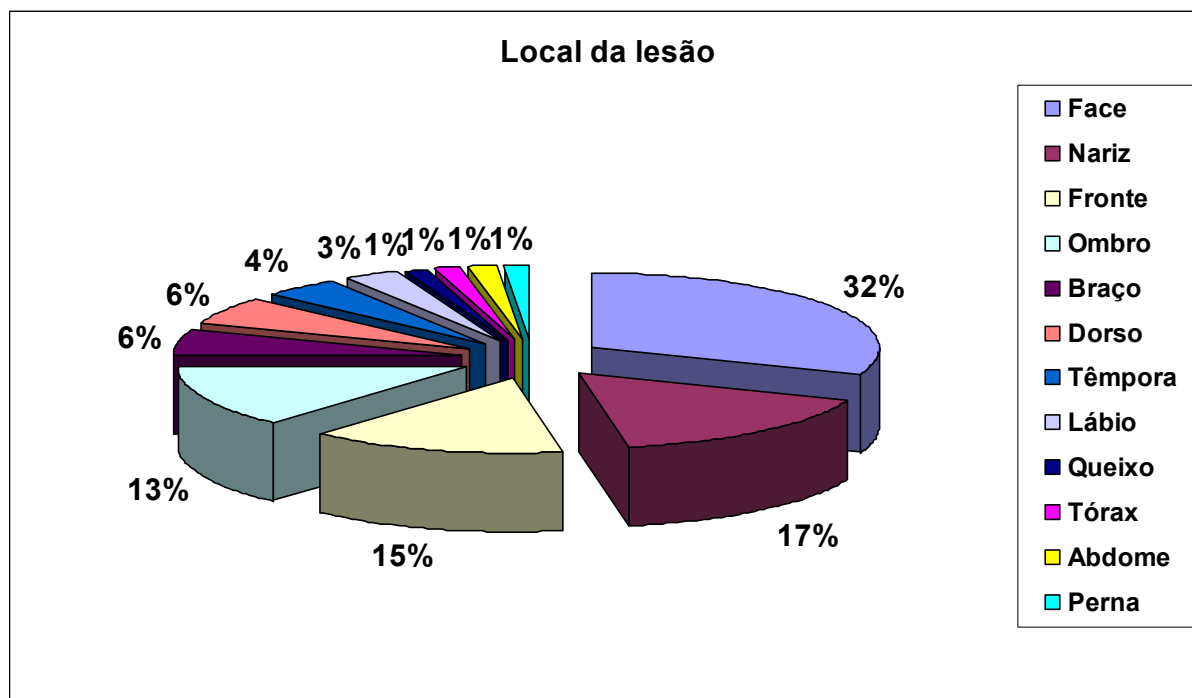


FIGURA 2: Distribuição relativa dos casos de acordo com o local da lesão.

5.2- Morfológicos microscópicos

A Tabela 1 mostra que foi possível agrupar os casos de Carcinoma Basocelular (CBC) nos seguintes subtipos: Circunscrito (10), Infiltrativo (20), Superficial (18), Adenóide (10), Folicular (3), Cístico (4) e Morfea (6), totalizando 71 pacientes, de acordo com a classificação de Lever, W.F. (1991). Dessa forma, foi considerado apenas o padrão principal de cada tumor, sendo o Infiltrativo (28,2%) e o Superficial (25,3%) os mais frequentes.

O CBC Infiltrativo ou Trabecular (Figura 4) caracteriza-se pela presença de cordões neoplásicos que infiltram na derme e, segundo Lever (1991) e Lefel (2000), estes cordões são formados por células da paliçada e da periferia, com poucos elementos centrais e estroma comportando-se com um padrão sólido, porém com limites mal definidos. O CBC Superficial (Figura 5), segundo Lever (1991) e Dipgen & Mahler (2002) mostra proliferações irregulares de tecido tumoral, ligadas à superfície superior da epiderme, onde, em muitos casos, há uma pequena penetração da derme superficial; o estroma é pouco fibroso e os limites são mal definidos.

Os subtipos Circunscrito e Adenóide responderam por 14% dos casos estudados. O Circunscrito ou Nodular caracteriza-se por massas tumorais de vários tamanhos, limites definidos e formas embebidas na derme (Figura 3). O estroma peritumoral mostra uma reação fibroconjuntiva e celular, podendo ter um padrão infiltrante. Já o subtipo Adenóide mostra formações tubulares, de limites bem definidos com estruturas tipo "glândulas" e, segundo Lever (1991) e Scrivener e cols. (2002), as células estão dispostas radialmente ao longo de "ilhas" de tecido conectivo comumente exibindo uma forma de "renda" (Figura 6).

O Folicular (Figura 7) mostra cada folículo piloso mais ou menos distorcido pela proliferação de "ilhas" de células basais estendendo-se para baixo da superfície da epiderme. O subtipo Cístico, uma variante do Nodular, (Figura 8)

apresenta espaços císticos no centro das massas tumorais formados pela degeneração de grandes massas tumorais ou pela diferenciação celular no centro das mesmas. Segundo Lever (1991) e Widgerow, A.D. & Christofides, T. (2006), o Morfea ou Esclerodermiforme (Figura 9), é uma variedade de crescimento agressivo, limites mal definidos, com grande participação do tecido conectivo, onde inúmeros grupos de células tumorais estão embebidas num denso estroma fibroso ou esclerótico, e arranjadas em fibras alongadas que tendem a infiltrar.

5.3- Histoquímicos e imunohistoquímicos

A Tabela 2 ilustra os valores médios totais da análise morfométrica das imunohistoquímicas, independente do subtipo de CBC. Foram usados os seguintes anticorpos para tal marcação: anti-(CD3, CD20, CD8, CD4, CD68, Ki-67 e MAST cell). Além destes dados, a referida tabela mostra também os resultados histoquímicos provenientes da técnica de Azul de Toluidina, para a coloração de mastócitos na mesma área analisada. Esta técnica mostrou-se tão eficiente quanto a imunohistoquímica na detecção de mastócitos, fato este comprovado pela análise de variância (One Way ANOVA) e pelos pós-testes Turkey's e Newman-Keuls, comparando as médias do número total de mastócitos marcados com as duas técnicas, que revelaram não existir diferença estatisticamente significativa entre elas ($p > 0,05$).

São evidenciados, além dos valores de Média (X), o Desvio Padrão (SD) e o Erro Padrão (SE) da variável "total de células marcadas", com cada anticorpo utilizado. Os valores das médias variaram de 21,18 a 308,90. Com relação ao Desvio Padrão, os valores variaram entre 21,68 e 229,70. O Erro Padrão mostrou valores de 2,58 a 27,26.

TABELA 2: Dados estatísticos primários do número total de células imunomarcadas em todos os pacientes, independente do subtipo de CBC, na área total de 710.388 μm^2 ,

ANTICORPOS	CD3	CD20	CD4	CD8	CD68	Ki-67	MAST	Azul Toluidina
n	71	71	71	71	71	71	71	71
X	308,90	55,90	216,20	57,38	21,18	47,61	111,0	83,27
SD	229,70	57,58	187,30	50,09	21,78	63,07	66,37	47,97
SE	27,26	6,83	22,23	5,94	2,58	7,48	7,88	5,69

n- número de casos

X- média

SD- desvio padrão

SE- erro padrão

As Tabelas 3 a 9 demonstram os valores de X, SD e SE, dentro de cada subgrupo de estudo, para cada anticorpo testado. No subgrupo Sólido Circunscrito (Tabela 3), a média de células imunomarcadas variou de 16,80 (CD68) a 190,50 (CD3). O subgrupo Infiltrativo (Tabela 4) demonstrou valores médios variando 18,50 (Ki-67) a 282,40 (CD3).

Na Tabela 5, observa-se os valores referentes ao subtipo Superficial (Figura 5), com média variando de 17,78 (CD68) a 323,40 (CD3). O subtipo Adenóide (Figura 6), representado na Tabela 6, apresentou valores médios de células marcadas que variaram entre 4,40 (ki-67) e 686,20 (CD3). Na Tabela 7, o subtipo Folicular (Figura 7) apresentou médias que variaram de 21,0 (CD68) a 178,30 (CD3). O subtipo Cístico (Tabela 8) (Figura 8) demonstrou valores médios de 2,25 (Ki-67) a 40,25 (CD3). Na Tabela 9 foram representados os valores relacionados com o subtipo Morfea (Figura 9), que apresentou médias que variaram de 24,83 (CD68) a 217,80 (ki-67).

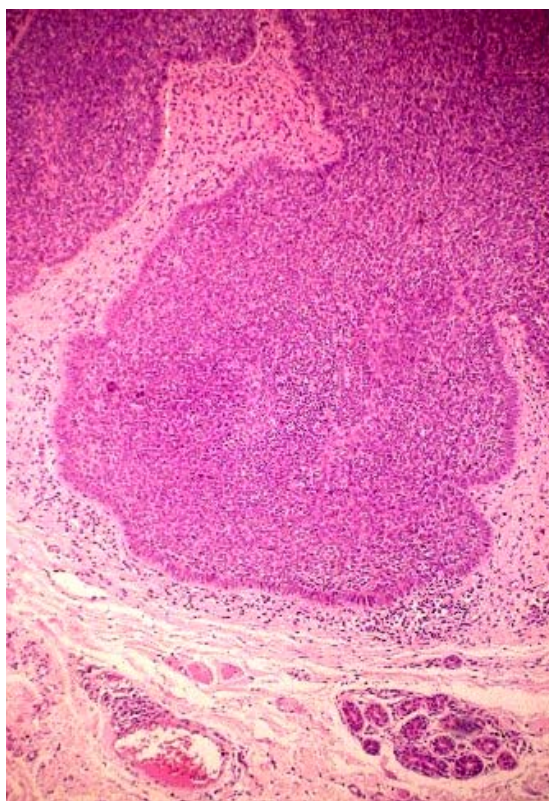


FIGURA 3: Carcinoma Basocelular tipo Sólido Circunscrito. Coloração em HE (Aumento 200X).

TABELA 3: Dados estatísticos do número de células marcadas no subgrupo Sólido Circunscrito.

Circunscrito	CD3	CD20	CD4	CD8	CD68	Ki-67	MAST	Azul Toluidina
n	10	10	10	10	10	10	10	10
X	190,50	24,00	131,70	22,40	16,80	55,50	76,70	63,20
SD	118,10	11,82	86,31	19,87	20,87	42,85	31,82	25,61
SE	37,35	3,74	27,29	6,25	6,60	13,55	10,06	8,10

n- número de casos

X- média

SD- desvio padrão

SE- erro padrão

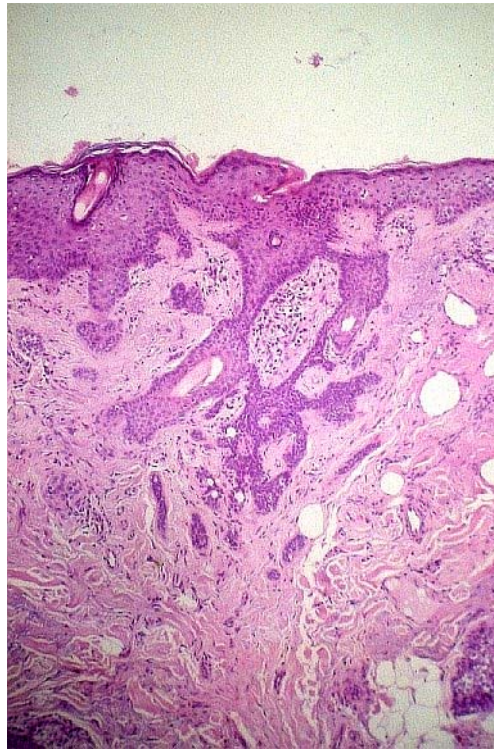


FIGURA 4: Carcinoma Basocelular tipo Infiltrativo. Coloração em HE. (Aumento 200X)

TABELA 4: Dados estatísticos do número de células marcadas no subgrupo Infiltrativo.

Infiltrativo	CD3	CD20	CD4	CD8	CD68	Ki-67	MAST	Azul Toluidina
n	20	20	20	20	20	20	20	20
X	282,40	117,80	206,40	50,40	31,65	18,50	111,10	95,50
SD	185,60	73,65	149,30	32,90	34,03	15,63	57,36	54,06
SE	41,51	16,47	33,38	7,36	7,61	3,49	12,83	12,09

n- número de casos

X- média

SD- desvio padrão

SE- erro padrão

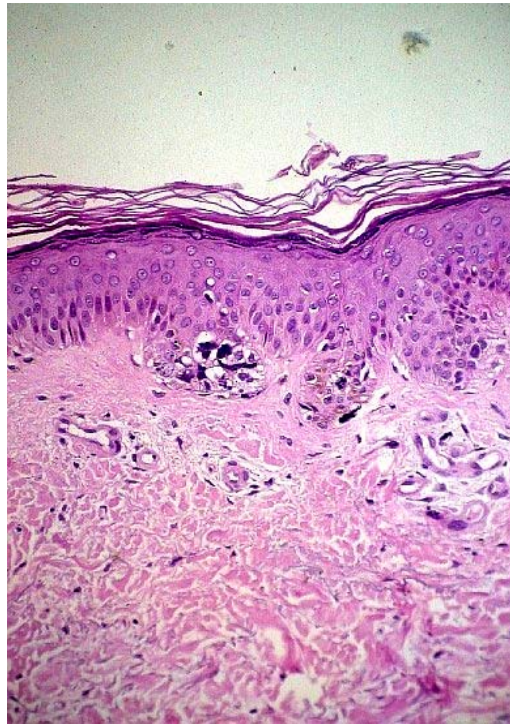


FIGURA 5: Carcinoma Basocelular tipo Superficial Coloração em HE. (Aumento 200X)

TABELA 5: Dados estatísticos do número de células marcadas no subgrupo Superficial.

Superficial	CD3	CD20	CD4	CD8	CD68	Ki-67	MAST	Azul Toluidina
ANTICORPOS	18	18	18	18	18	18	18	18
N	18	18	18	18	18	18	18	18
X	323,40	43,94	213,00	87,28	17,78	57,17	137,30	102,10
SD	196,10	22,77	132,00	75,61	11,51	27,21	69,91	53,63
SE	46,22	5,37	31,12	17,82	2,71	6,41	16,48	12,64

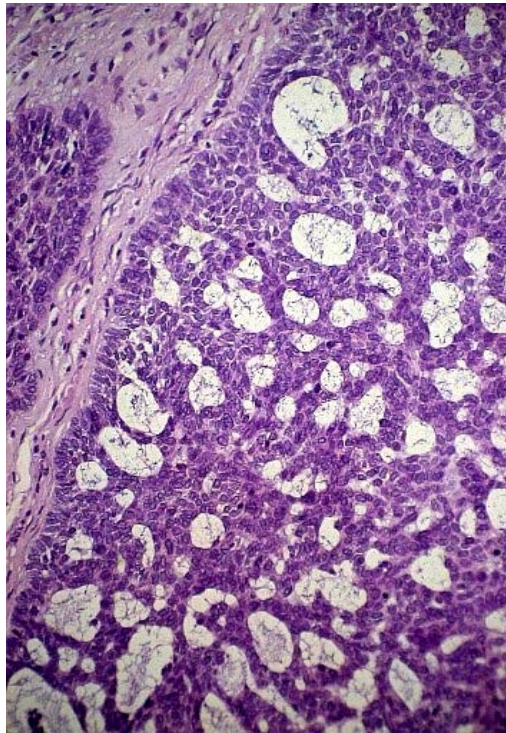


FIGURA 6: Carcinoma Basocelular tipo Adenóide. Coloração em HE. (Aumento 200X)

TABELA 6: Dados estatísticos do número de células marcadas no subgrupo Adenóide.

Adenóide								
ANTICORPOS	CD3	CD20	CD4	CD8	CD68	Ki-67	MAST	Azul Toluidina
n	10	10	10	10	10	10	10	10
X	686,20	13,00	529,40	86,00	15,90	4,40	48,30	43,50
SD	145,90	7,05	172,70	10,67	6,19	2,55	9,10	7,58
SE	46,13	2,23	54,60	3,37	1,96	0,80	3,16	2,40

n- número de casos

X- média

SD- desvio padrão

SE- erro padrão

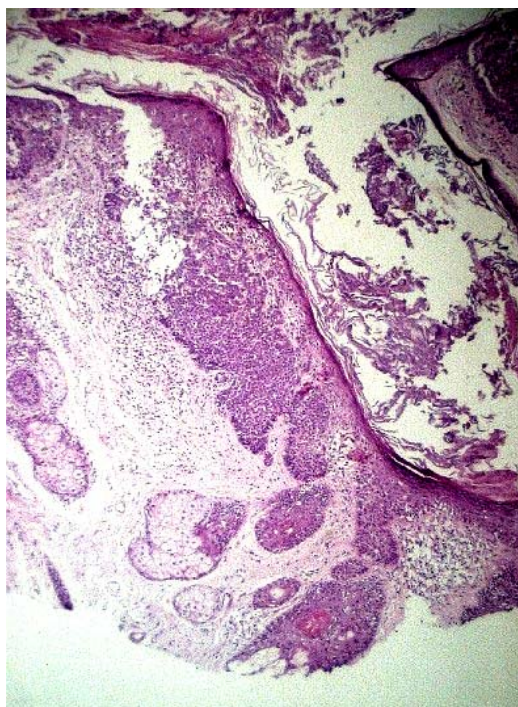


FIGURA 7: Carcinoma Basocelular tipo Folicular. Coloração em HE. (Aumento 200X)

TABELA 7: Dados estatísticos do número de células marcadas no subgrupo Folicular.

Folicular	CD3	CD20	CD4	CD8	CD68	Ki-67	MAST	Azul Toluidina
ANTICORPOS	3	3	3	3	3	3	3	3
n	3	3	3	3	3	3	3	3
X	178,30	66,67	115,00	55,33	21,00	26,33	42,33	31,00
SD	69,76	10,79	37,00	11,02	9,00	4,04	4,16	6,08
SE	40,28	6,23	21,36	6,36	5,20	2,33	2,40	3,51

n- número de casos

X- média

SD- desvio padrão

SE- erro padrão

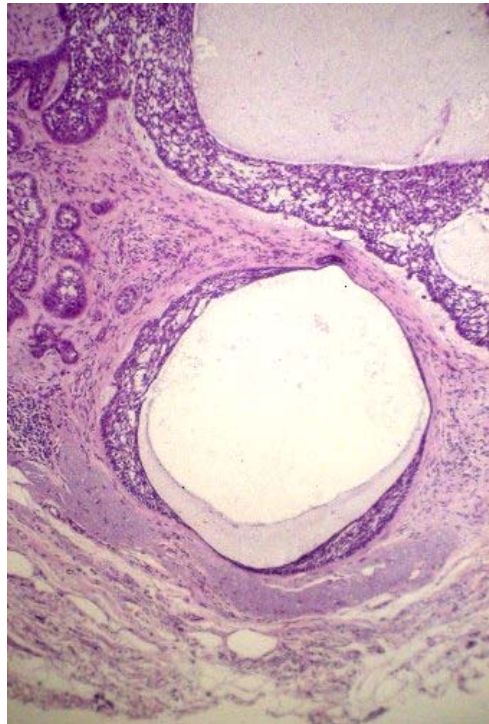


FIGURA 8: Carcinoma Basocelular tipo Cístico. Coloração em HE. (Aumento 200X)

TABELA 8: Dados estatísticos do número de células marcadas no subgrupo Cístico.

Cístico	CD3	CD20	CD4	CD8	CD68	Ki-67	MAST	Azul Toluidina
ANTICORPOS	4	4	4	4	4	4	4	4
n	4	4	4	4	4	4	4	4
X	40,25	20,25	18,75	3,75	3,00	2,25	100,50	88,25
SD	6,40	1,71	5,38	2,06	0,81	0,50	18,93	15,02
SE	3,20	0,86	2,70	1,03	0,41	0,25	9,46	7,51

n- número de casos

X- média

SD- desvio padrão

SE- erro padrão

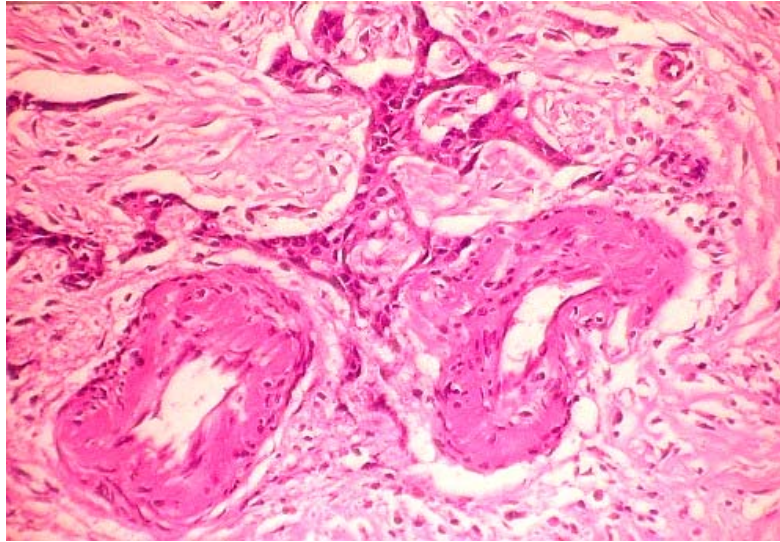


FIGURA 9: Carcinoma Basocelular tipo Morfea. Coloração em HE. (Aumento 200X)

TABELA 9: Dados estatísticos do número de células marcadas no subgrupo Morfea.

Morfea	CD3	CD20	CD4	CD8	CD68	Ki-67	MAST	Azul Toluidina
ANTICORPOS	6	6	6	6	6	6	6	6
n	6	6	6	6	6	6	6	6
X	166,80	28,67	60,00	38,33	24,83	217,80	211,70	108,50
SD	55,65	11,81	46,06	19,53	7,08	66,17	48,33	40,34
SE	22,72	4,82	18,80	7,97	2,89	27,01	19,73	16,47

n- número de casos

X- média

SD- desvio padrão

SE- erro padrão

Observa-se que, com relação ao anticorpo anti- CD3 (Figura 11), o maior número de células marcadas apresentou-se no subtipo Adenóide de CBC, com média de $686,20 \pm 46,13$ (Tabela 6) e o menor número foi representado no subtipo Cístico, com média de $40,25 \pm 3,2$ (Tabela 8). Com relação às subpopulações de linfócitos T, o anticorpo anti-CD4 (Figuras 12 e 13) mostrou maior número de células marcadas no grupo Adenóide, média de $529,4 \pm 54,6$ (Tabela 6) e menor número no grupo Cístico, média de $18,75 \pm 2,7$ (Tabela 8); já com o anticorpo anti-CD8 (Figuras 14 e 15), o grupo que apresentou maior número de células marcadas foi o Superficial, com média de $87,28 \pm 17,82$ (Tabela 5) e o Cístico com o menor número, média de $3,75 \pm 1,03$ (Tabela 8).

Com relação ao anticorpo anti-CD68 (Figuras 18 e 19), o grupo com maior número de células marcadas foi o Infiltrativo, média de $31,65 \pm 7,61$ (Tabela 4), enquanto que o grupo Cístico apresentou o menor número de células marcadas, média de $3,0 \pm 0,41$ células (Tabela 6). O anticorpo anti-MAST cell (Figuras 20, 21A, 21B e 22) apresentou média mais elevada de células marcadas ($211,7 \pm 19,73$) no grupo Morfea (Tabela 9) e menor média ($42,33 \pm 5,2$) no grupo Folicular (Tabela 7), dados ratificados pela técnica histológica de Azul de Toluidina para marcação de mastócitos. O anticorpo anti-Ki-67 (Figura 23) apresentou o maior número de células marcadas no grupo Morfea, com média de $217,8 \pm 27,01$ (Tabela 9) e menor número no grupo Cístico, com média de $2,25 \pm 0,25$ (Tabela 8).

O anticorpo anti-CD20 (Figuras 16 e 17) apresentou maior número de células marcadas no subtipo Infiltrativo, com média de $117,8 \pm 16,47$ (Tabela 4) e, como subtipo de menor número de células marcadas, o Adenóide, com média de $13,0 \pm 2,23$ (Tabela 6). A Figura 4 demonstra uma visão geral do infiltrado inflamatório total do CBC, utilizando técnica imunohistoquímica e histoquímica, independente do subtipo de CBC analisado.

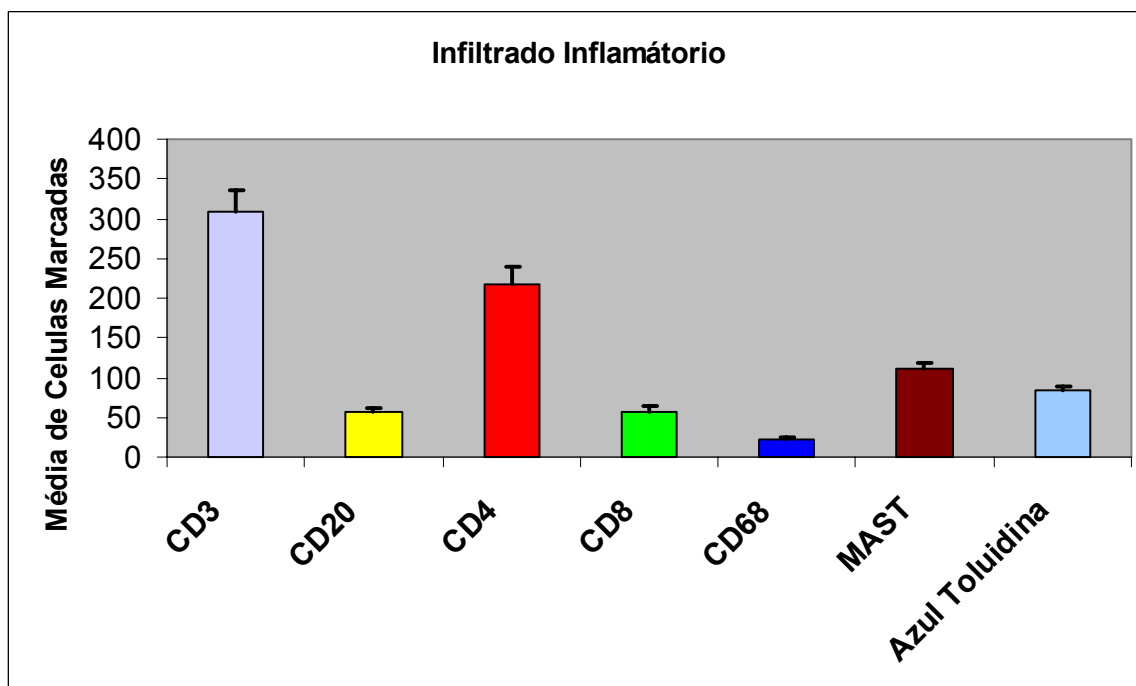


FIGURA 10: Os resultados representam a Média total de células marcadas \pm Erro Padrão ($X \pm SE$) caracterizando o infiltrado inflamatório no CBC.

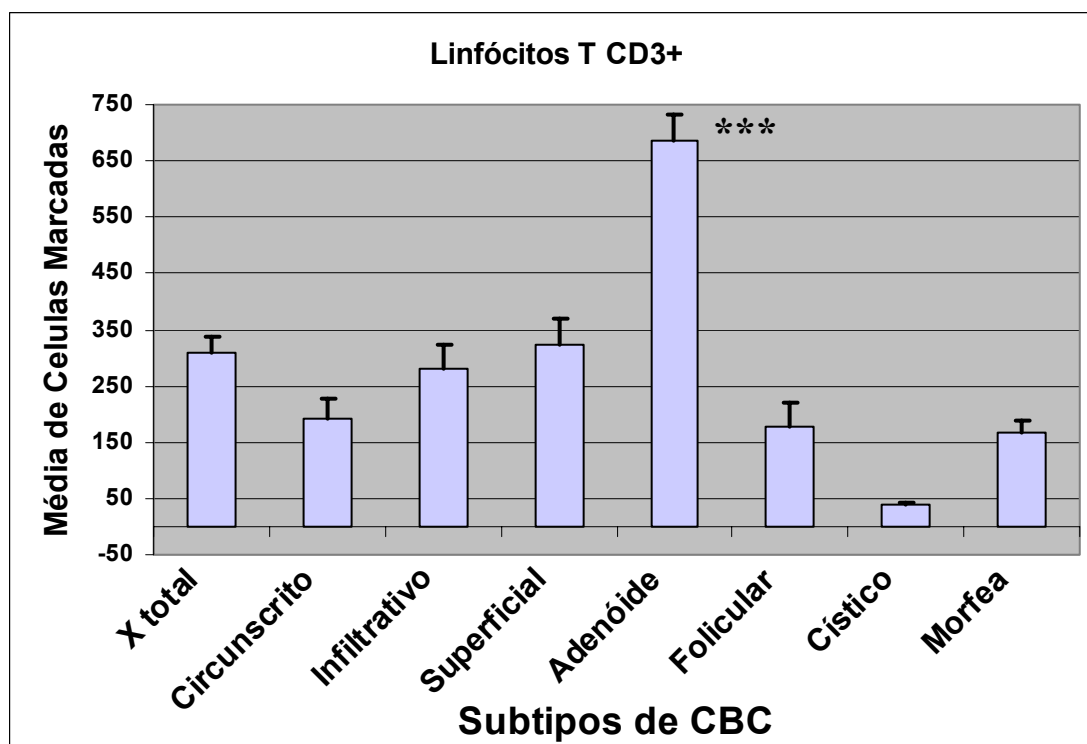


FIGURA 11: Resultados representando as médias de linfócitos T CD3+ no total de casos estudados e em cada subtipo histológico de CBC \pm Erro Padrão ($X \pm SE$). *** $p < 0,001$ (Turkey's + Newman-Keuls).

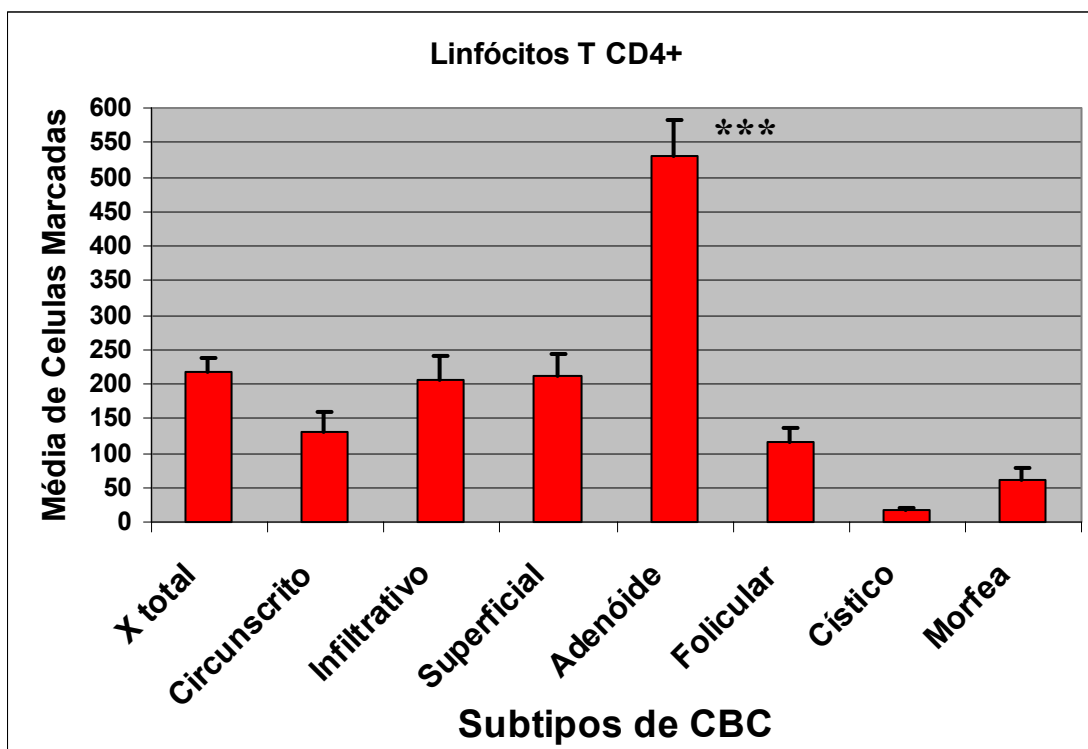


FIGURA 12: Resultados representando as médias de linfócitos T CD4+ no total de casos estudados e em cada subtipo histológico de CBC \pm Erro Padrão ($X \pm SE$). *** $p < 0,001$ (Turkey's + Newman-Keuls).

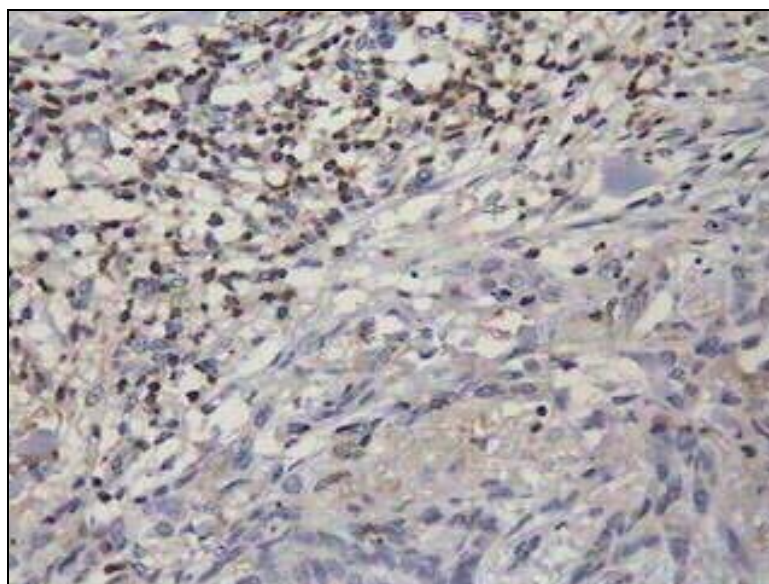


FIGURA 13: Imunomarcção para linfócitos T CD4+ em infiltrado inflamatório (à esquerda e acima) de CBC tipo Adenóide. Aumento 400X.

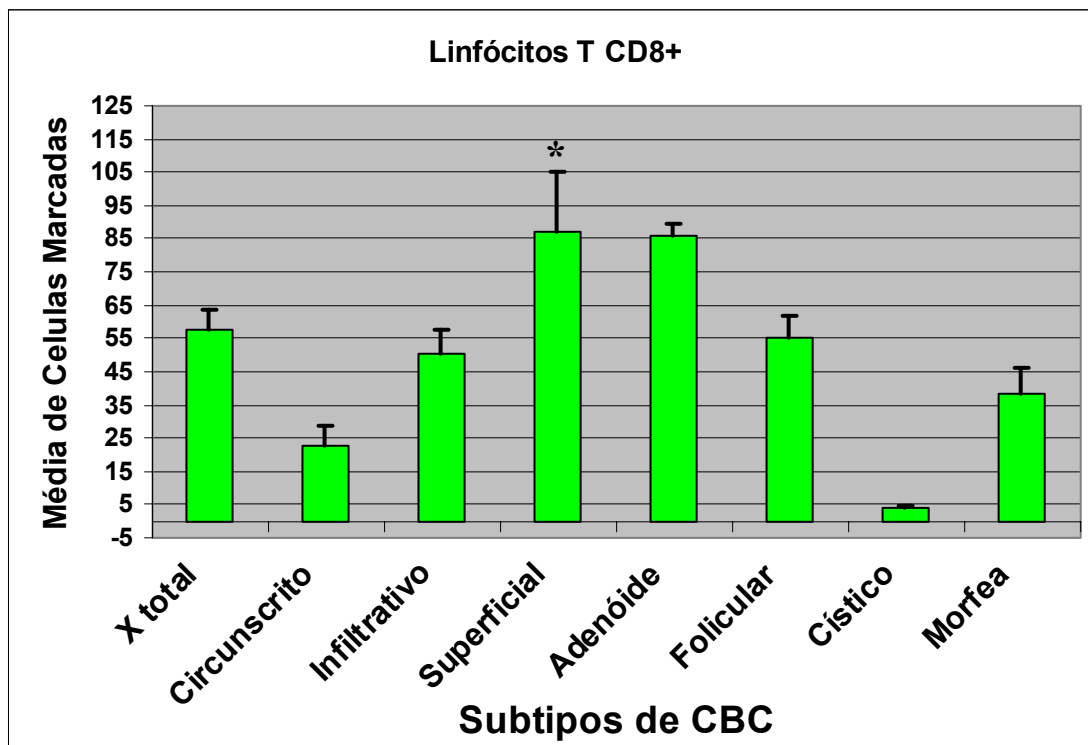


FIGURA 14: Resultados representando as médias de linfócitos T CD8+ no total de casos estudados e em cada subtipo histológico de CBC ± Erro Padrão (X±SE). * $p < 0,05$ (Turkey's + Newman-Keuls).

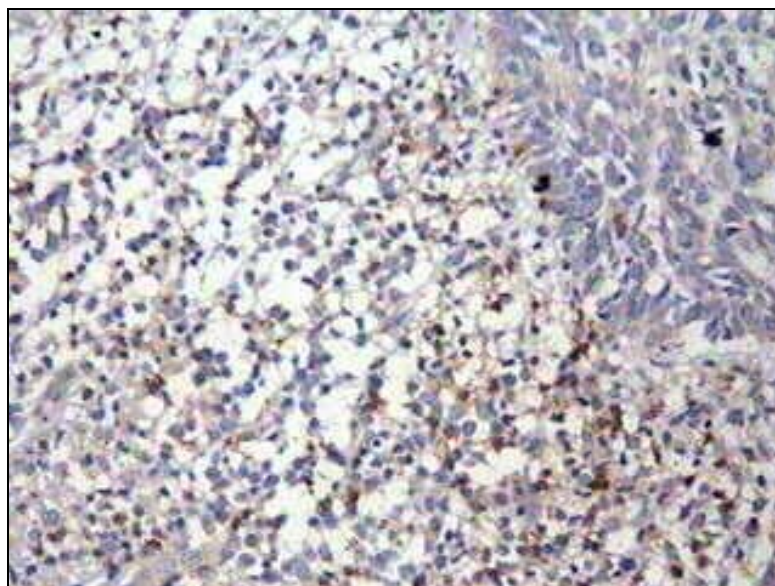


FIGURA 15: Imunomarcção para linfócitos T CD8+ em infiltrado inflamatório de CBC tipo Superficial. Aumento 400X.

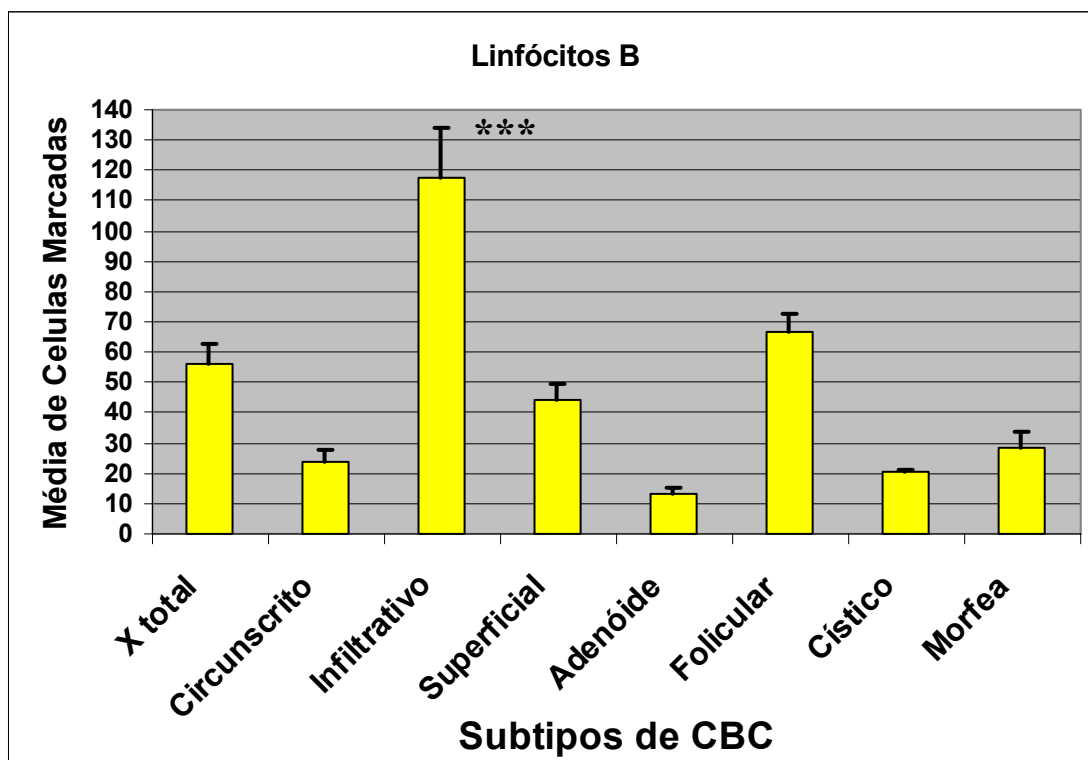


FIGURA 16: Resultados representando as médias de linfócitos B (CD20+) no total de casos estudados e em cada subtipo histológico de CBC ± Erro Padrão (X±SE).

*** p<0,0001 (Turkey's + Newman-Keuls).

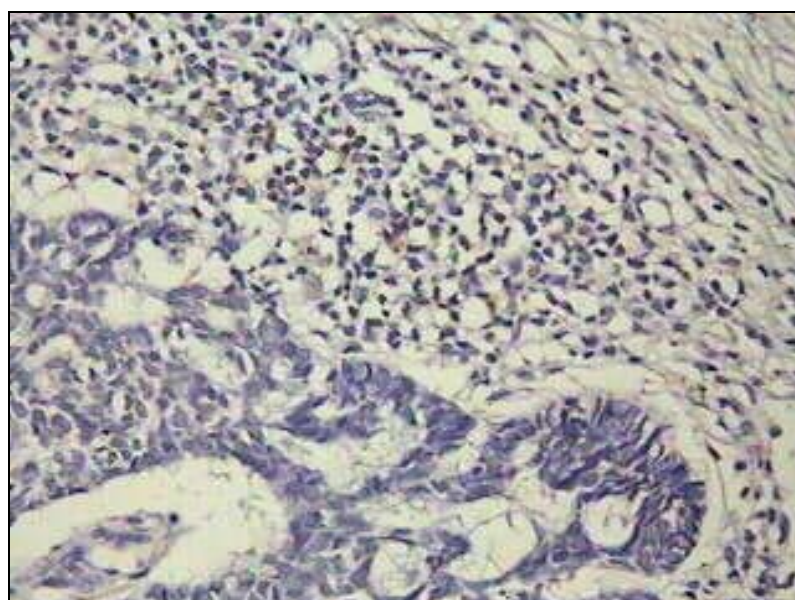


FIGURA 17: Imunomarcção para linfócitos B (CD20+) em infiltrado inflamatório de CBC tipo Infiltrativo. Aumento 400X.

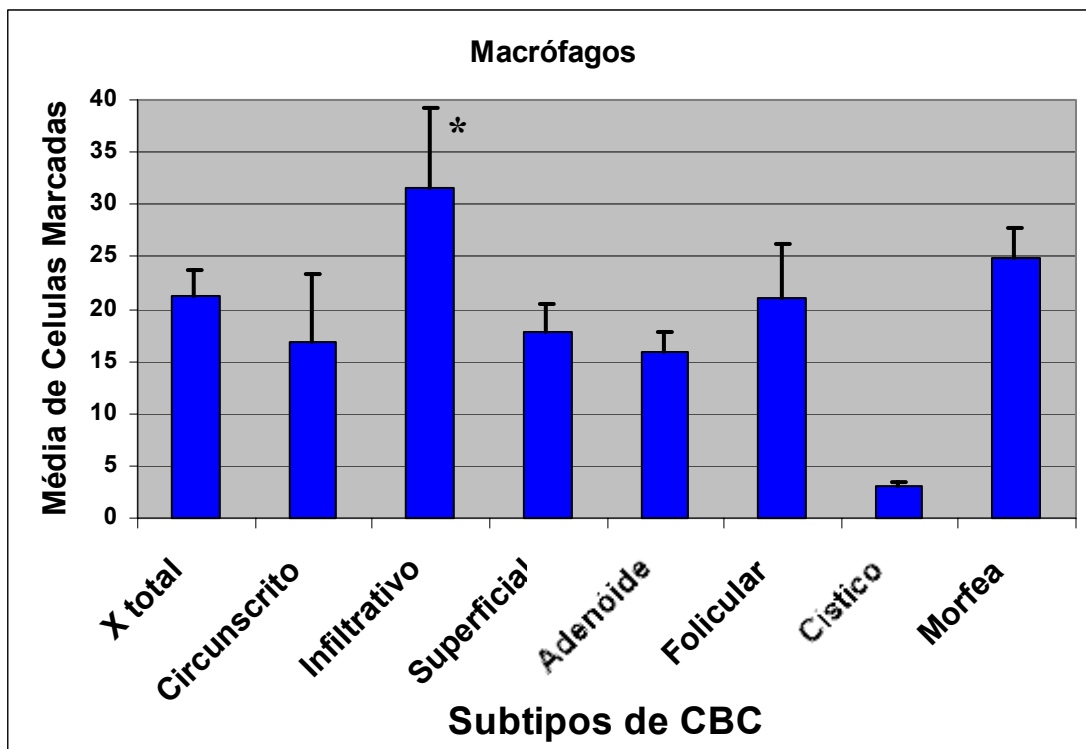


FIGURA 18: Resultados representando as médias de macrófagos no total de casos estudados e em cada subtipo histológico de CBC \pm Erro Padrão ($X \pm SE$). * $p < 0,05$ (Turkey's + Newman-Keuls).

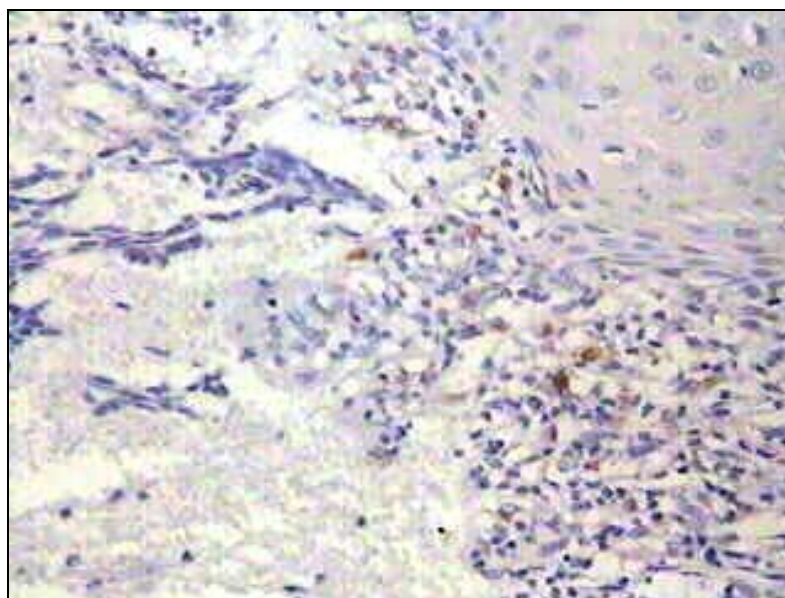


FIGURA 19: Imunomarcção para macrófagos em CBC tipo Infiltrativo. Aumento 400X.

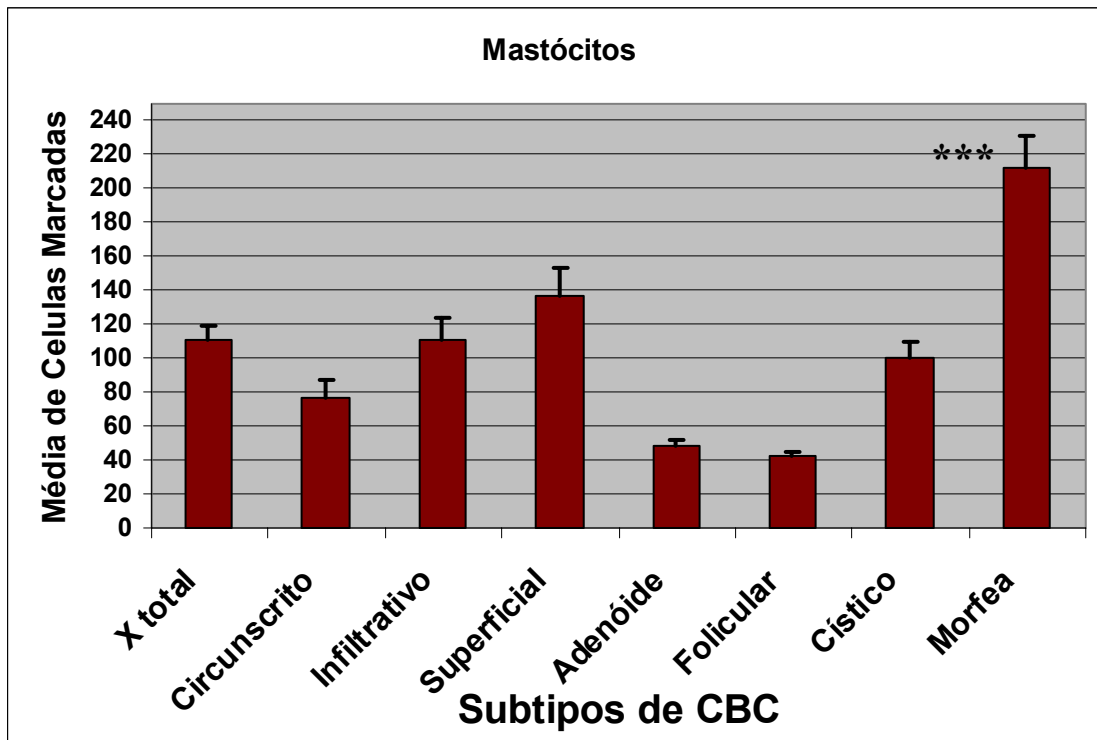


FIGURA 20: Resultados representando as médias de mastócitos no total de casos estudados e em cada subtipo histológico de CBC \pm Erro Padrão ($X \pm SE$).

*** $p < 0,0001$ (Turkey's + Newman-Keuls).

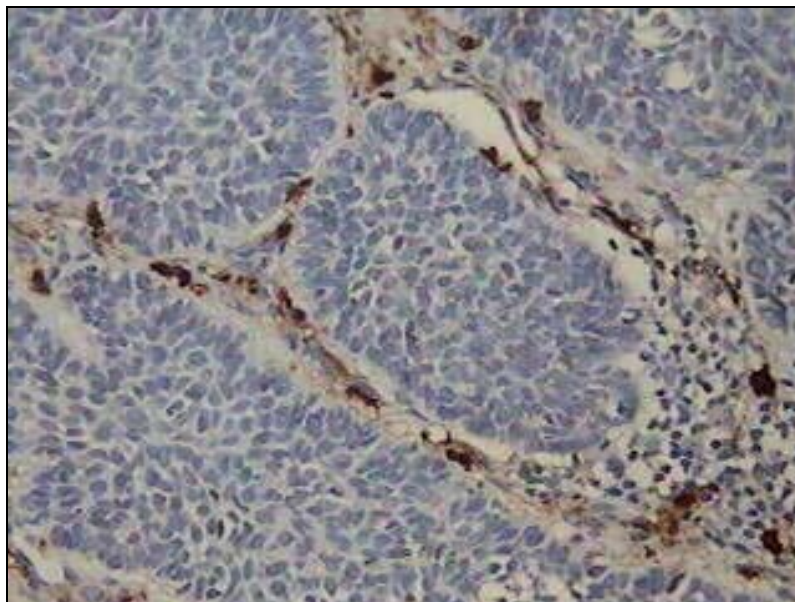


FIGURA 21A: Imunomarcção de CBC evidenciando mastócitos ao redor de "ilhas" tumorais. Aumento 400X.

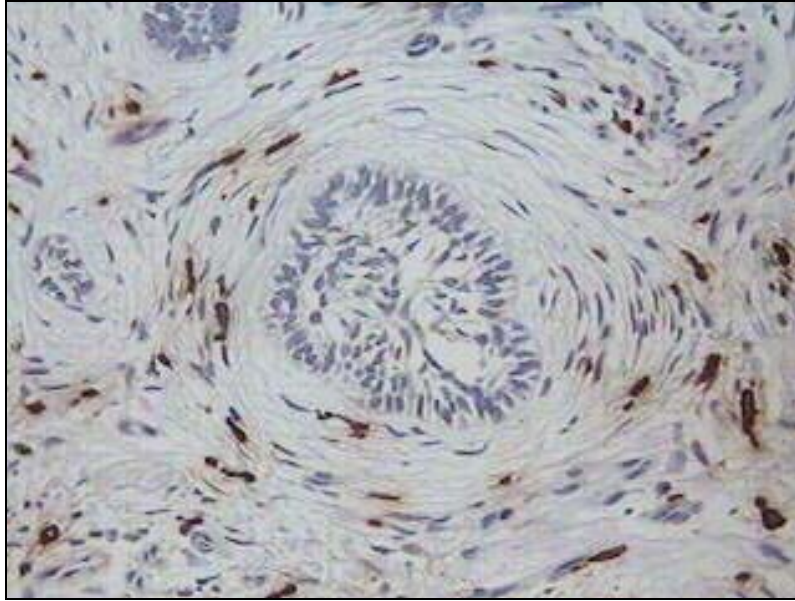


FIGURA 21B: Imunomarcção de CBC evidenciando mastócitos ao redor de "ilhas" tumorais. Aumento 400X.

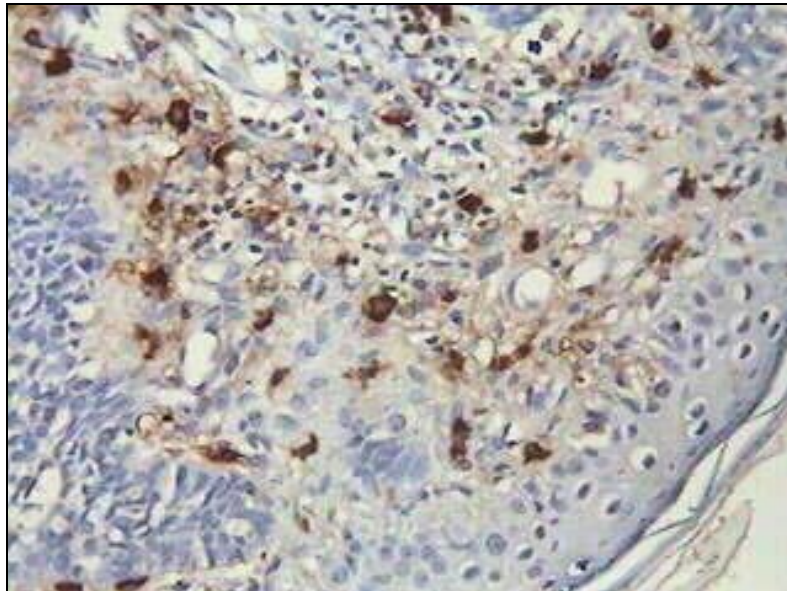


FIGURA 22: Imunomarcção de CBC tipo Superficial evidenciando os mastócitos do infiltrado inflamatório. Aumento 400X.

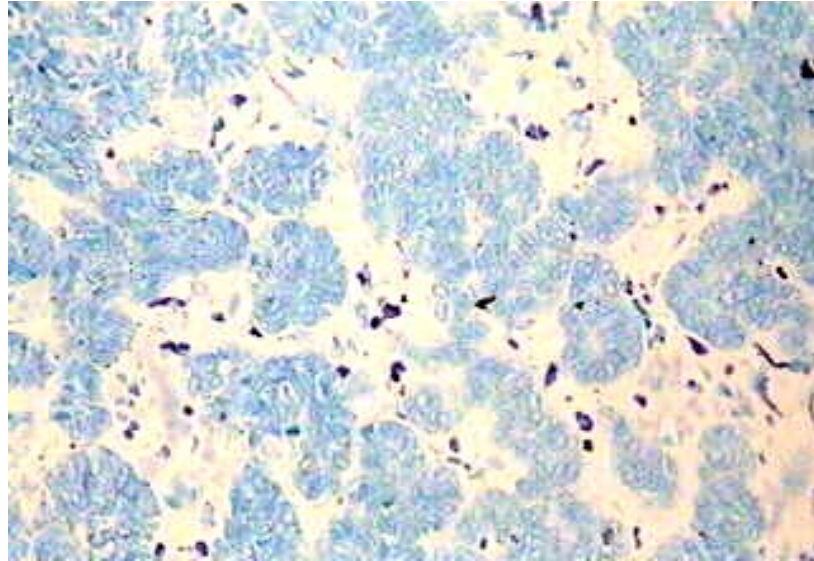


FIGURA 23: Técnica histológica de azul de toluidina para marcação de mastócitos em CBC Superficial. Aumento 200X.

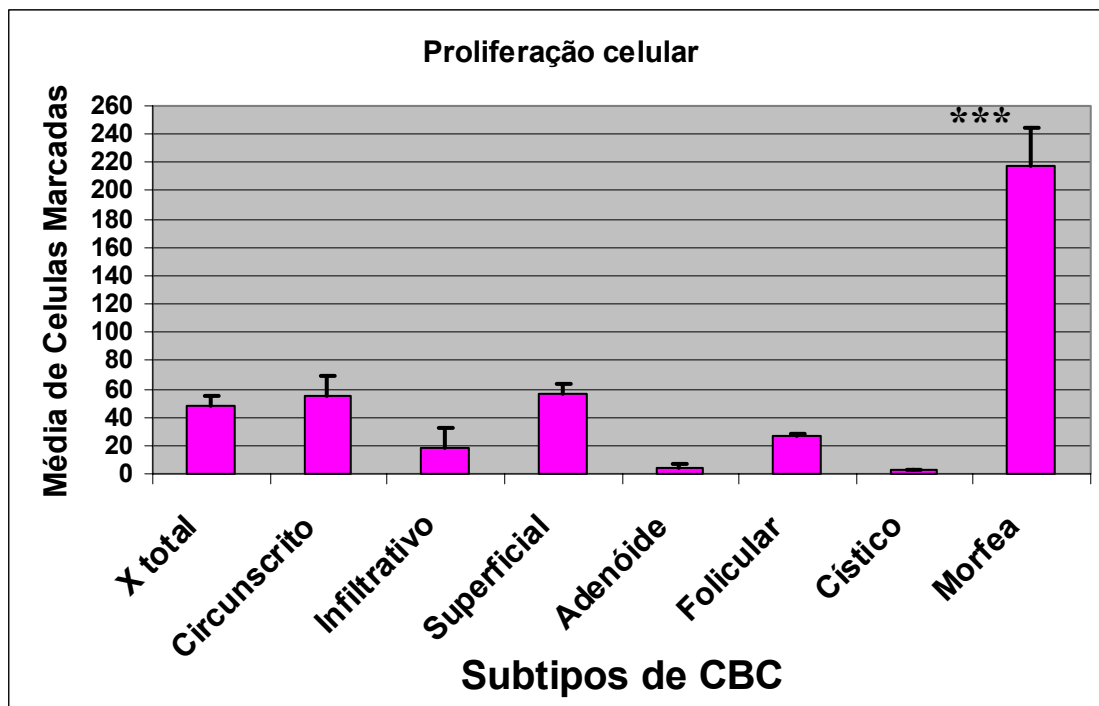


FIGURA 24: Resultados representando as médias de células em proliferação (Ki-67+) no total de casos estudados e em cada subtipo histológico de CBC ± Erro Padrão (X±SE).

***p < 0,0001.

6- DISCUSSÃO

6- DISCUSSÃO

6.1- Dados epidemiológicos

O Carcinoma Basocelular (CBC) é a neoplasia epidérmica mais freqüente dos humanos, correspondendo a 65% dos tumores epiteliais, chegando a 20% de todos os carcinomas no homem e 10 a 15% de todos os carcinomas na mulher (JANOWSKI, P. & STRZELECKI, M., 2001). Neste estudo, encontramos maior ocorrência do gênero masculino (70%) que do feminino (30%) no total de casos analisados, o que está de acordo com os achados de Cohen, M.S. (1995); Bastiaens, M.T. e cols (1998); Puizina-Ivic, N. e cols (1999); Bandeira, A.M. e cols (2003); Jiang, S.B. & Szyfelbein, K. (2005) e Nasser, N. (2005). Estes valores, entretanto, discordam do estudo de Mantese e cols (2006) onde os autores encontraram na população de Uberlândia (MG) uma freqüência maior (59,3%) de mulheres acometidas pelo CBC. Esta diferença pode ter ocorrido pelo fato de em cidades como a do presente estudo (Salvador-Ba) por serem litorâneas, o uso de foto-proteção é mais difundido entre as mulheres, diferentemente do observado em cidades interioranas como Uberlândia.

A idade variou entre 17 e 84 anos com média de $56,9 \pm 14,2$ anos (Tabela 1). Estes dados corroboram os achados de Bandeira, A.M. e cols (2003), Jiang, S.B. e Szyfelbein, K. (2005) e Nasser, N. (2005) que demonstram que a incidência de CBC aumenta com a idade e ocorre mais frequentemente em homens entre 51 e 75 anos, provavelmente devido ao maior tempo de exposição solar. Outro dado mostrado na Figura 2 relaciona-se ao local de apresentação clínica do tumor. Segundo os estudos de Gordon e cols. (2000) e Mantese e cols (2006), aproximadamente 86% das lesões ocorrem na região da cabeça e pescoço, com 25% de todas as lesões primárias ocorrendo na face, dados próximos aos encontrados no presente estudo, onde se verificou a maior freqüência das lesões (32%) ocorrendo na face.

Segundo Ackerman's (1996) e Jiang & Szyfelbein (2005), numerosos subtipos morfológicos são descritos para as apresentações clínicas do CBC. No presente estudo, adotou-se a classificação de Lever, W.F. (1991) para a identificação dos subtipos (Tabela 1). Os mais freqüentes foram o Infiltrativo (28,2%) e o Superficial (25,3%). Estes dados estão de acordo com outros estudos que consideram os mesmos subtipos, os mais freqüentes entre os casos de CBC (RIPPEY, 1998; HERRERA, 1999; TRAN, 2003).

Fernández, e cols. (2003), Ishi e cols (2004) e Jiang & Szyfelbein (2005) sugerem que o padrão Circunscrito (Sólido ou Nodular) e o Infiltrativo sejam os mais freqüentes, correspondendo a 70% e 15% respectivamente. Mantese e cols (2006), no entanto, encontraram em seu estudo maior freqüência o subtipo Nodular, seguido do subtipo Superficial. Nos dados do presente trabalho verificou-se que o Infiltrativo e o Superficial foram os mais freqüentes enquanto que o subtipo Circunscrito contribuiu apenas com 14% do total de casos analisados. Estas discrepâncias entre os estudos provavelmente ocorrem devido ao tipo de classificação adotada por cada pesquisador. Exemplo disso é que o Circunscrito e o Infiltrativo podem ser considerados variantes do mesmo tipo de tumor, o Nodular. Outro fator que também pode afetar a freqüência dos subtipos relaciona-se às diferenças inerentes a cada população de estudo.

Os subtipos Folicular, Cístico e Morfea foram os menos freqüentes neste estudo, fato corroborado por outros autores (LEVER, 1990; LÓPEZ, R.F.R. & MARTÍNEZ, L.A.D., 2002; SCRIVENER, Y. e cols, 2002; DIPGEN, T.I. & MAHLER, V., 2002 e FERNÁNDEZ, K. e cols, 2003) que os consideram formas mais raras de CBC.

6.2- Infiltrado inflamatório

Neste estudo encontramos que o Carcinoma Basocelular apresentou infiltrado inflamatório composto de diferentes tipos celulares, variando seu número de acordo com o subtipo de tumor, o que está de acordo com os achados de Habets e cols (1988); Deng e cols. (1996) e Navarrete & Zemelman (2001). Estas células localizam-se principalmente ao redor das "ilhas" tumorais e apenas poucas delas invadem os agregados de tumor (Figuras 21A e 21B), o que está de acordo com os estudos de Rohrbach e cols (2001).

Em relação à composição do infiltrado dos subtipos de CBC, observamos que os subtipos Circunscrito e o Cístico possuem infiltrado inflamatório discreto. O subtipo Infiltrativo apresentou infiltrado rico em linfócitos T CD4⁺, linfócitos B e mastócitos. O subtipo Superficial mostra infiltrado rico em linfócitos T CD4⁺, T CD8⁺ e mastócitos, enquanto que o Folicular e o Adenóide revelam infiltrado inflamatório formado em sua maioria, por linfócitos T CD4⁺. O subtipo Morfea apresentou o infiltrado rico em mastócitos e células tumorais em proliferação. Concluímos a quantidade de células do infiltrado inflamatório varia de acordo com o subtipo de CBC. Isto pode ocorrer devido ao micro-ambiente tecidual gerado por cada subtipo de tumor, o que poderia regular as características do infiltrado inflamatório peritumoral e, conseqüentemente, interferir na qualidade da resposta imunológica anti-tumor.

É importante salientar, entretanto, que não foi possível estabelecer uma correlação entre agressividade tumoral e composição do infiltrado inflamatório, pois, observou-se a mesma composição do infiltrado inflamatório em tumores de comportamento agressivo, como o Morfea, e em tumores pouco agressivos como o Cístico. O mesmo foi observado com relação aos mastócitos, pois tanto tumores agressivos (Morfea) quanto os de comportamento menos infiltrante (Superficial), apresentaram grande quantidade destas células no infiltrado peritumoral. Os resultados encontrados podem indicar que os mastócitos podem

tanto promover supressão imune como desempenhar um importante papel na defesa imunológica. Os resultados relatados podem indicar também que no subtipo Morfea, o processo fibroso mediado pelos mastócitos tenha a função de impedir a propagação maior do tumor, demonstrando o papel destas células na resposta anti-tumor.

6.2.1- Linfócitos T (CD3/ CD4/ CD8)

As células do infiltrado marcadas com o anticorpo anti-CD3, sem considerar o subtipo de tumor, foram as mais numerosas ($308,9 \pm 27,26$). Ou seja, no presente trabalho, os linfócitos T corresponderam à maior população celular do infiltrado inflamatório em zona peritumoral de CBC, diferindo estatisticamente do número de linfócitos B ($p < 0,001$), como também indicam outros trabalhos (ROHRBACH, 2001; SARRÓ, 2003 e AOKI e cols, 2003).

A média de linfócitos Th ($CD4^+$) foi aproximadamente quatro vezes maior que a de linfócitos T citotóxicos ($CD8^+$) ($57,58 \pm 5,94$) ($p < 0,001$) (Figuras 10 e 15). Estes resultados coincidem com os dados de vários estudos onde, comparando e caracterizando subpopulações de linfócitos T, os autores também encontraram uma maior população de linfócitos Th (auxiliares) que de linfócitos Tc (citotóxicos), em infiltrado inflamatório de tumores cutâneos (WRANKE & LEVY, 1980; ERNST & MULLER-MAI, 1987; HABETS e cols, 1988; MOZZANICA e cols, 1990; UGARTE, 1995; DENG, 1998; ROHRBACH, 2001; SARRO, 2003 e AOKI e cols, 2003).

Estes achados sugerem que os linfócitos Th ($CD4^+$) são responsáveis por dirigir a resposta imunológica nestes tipos de tumores, através da regulação da atividade proliferativa nas células epiteliais periféricas do tumor. No entanto, no estudo de Claudatus e cols (1986), comparando o infiltrado inflamatório de carcinomas basocelulares e escamosos, os autores observaram baixas quantidades de linfócitos T ($CD4^+$ e $CD8^+$), enquanto que o estudo de Ugarte

(1995) não encontra diferença significativa entre as duas populações de linfócitos em carcinomas de pele.

6.2.2- Linfócitos B (CD20)

O número de linfócitos B (CD20⁺) foi mais baixo quando comparado com os outros subtipos celulares do infiltrado inflamatório ($p < 0,001$). Este resultado é corroborado por estudos prévios em que a quantidade de linfócitos B e de células NK foi muito pequena no infiltrado inflamatório de áreas peritumorais de CBC (WRANKE & LEVY, 1980; ERNST & MULLER-MAI, 1987; HEBETS e cols, 1988; MOZZANICA e cols, 1990; DENG e cols, 1996 e SARRÓ, 2003).

Estes resultados sugerem que a resposta humoral, mediada por célula B, e a mediada por linfócitos NK, sejam reduzidas nestes tipos de tumores, provavelmente pelo ambiente tecidual onde o tumor se desenvolve, evidenciando um papel menor destes tipos celulares na defesa local contra a proliferação do CBC. Ou seja, a resposta imunológica no CBC é basicamente mediada por célula. Entretanto, em outros tipos de neoplasias da pele, como o carcinoma escamoso, as células B e NK possuem intensa participação na imunidade, como evidenciam alguns estudos (KOHCHIYAMA e cols, 1986 e MOORE e cols, 2003).

6.2.3- Macrófagos (CD68)

Neste estudo pode-se observar que as células menos numerosas do infiltrado inflamatório peritumoral do CBC foram os macrófagos marcados através da proteína lisossomal CD68. Estes dados correspondem aos encontrados nos estudos de outros autores que onde estes autores também encontraram baixos índices de macrófagos no infiltrado inflamatório peritumoral (SYNKOWSKI e cols, 1985; ERNST & MULLER-MAI, 1987; HEBETS e cols, 1988;

MOZZANICA e cols, 1990 e SARRÓ, 2003). Entretanto, os dados de Li, C. (2002) com carcinoma escamoso oral, demonstraram que existe um denso infiltrado inflamatório composto por macrófagos que, sob algumas condições, secretam fatores que promovem angiogênese tumoral. Ou seja, a composição do infiltrado inflamatório peritumoral provavelmente depende das condições micro-ambientais e das características particulares de cada tipo de tumor.

6.2.4- Mastócitos

O segundo tipo celular mais numeroso neste estudo, na região peritumoral de CBC, foi o mastócito, apresentando valor médio de $111 \pm 7,88$ tanto pela técnica de imunohistoquímica, como pela técnica do azul de toluidina. O aumento do número de mastócitos também foi observado em outros estudos prévios, evidenciando um aumento destas células em zonas peritumorais de CBC (YANG, 1989; COHEN e cols, 1995; DENG e cols, 1996; GRIMBALDESTON e cols, 2000 E 2003; JANOWSKI & STRZELECKI, 2001 E ERKILIC & ERBAGCI, 2001).

Alguns autores têm sugerido que os mastócitos em zonas peritumorais de CBC induziriam um processo de imunossupressão, através de fatores liberados pelo tumor, e promoveriam angiogênese, através dos mediadores inflamatórios mastocitários (heparina, histamina, TNF α e FGF), o que auxiliaria o crescimento tumoral (TANOOKA e cols, 1982; DETHLEFSEN e cols, 1994; COHEN e cols, 1995; GRIMBALDESTON e cols, 2000 E 2003; AL-SARIREH & EREMIN, 2000; RIBATTI e cols, 2001; BANDEIRA e cols, 2003; SMIRNOVA e cols, 2005 E CH'NG e cols, 2006). Estas observações também foram feitas em outros tipos de tumor como mama (DIMITRIADOU & KOUTSILIERIS, 1997) e rim (DE CIDRE & SACERDOTE DE LUSIG, 1990 e ROBERTS & BRENCHLEY, 2000). Outro estudo sugere que os mastócitos induzem também dano tecidual (quimase), síntese de vasodilatadores (quinogenases) e crescimento tumoral (CSF, NGF, PDGF e SCF), evidenciando o papel destas células na tumorigênese (THEOHARIDES & PIO

CONTI, 2004). Outro dado importante é que a técnica histológica de azul de toluidina mostrou-se tão eficiente quanto a imunohistoquímica usada para marcar os mastócitos do infiltrado inflamatório, já que esta técnica é mais econômica, fácil e rápida.

O trabalho de Cohen, M.S. e cols (1995) sugere que não existe correlação entre a densidade do infiltrado inflamatório peritumoral e a densidade dos mastócitos. Ou seja, o grau de infiltração peritumoral não contribui para o aumento do número de mastócitos ao redor do tumor. No presente estudo, este resultado também foi observado, pois nos subtipos circunscrito, infiltrativo, superficial, adenóide e folicular de CBC, a média de linfócitos do infiltrado foi sempre superior à de mastócitos, excetuando os subtipos cístico e morfea, formas onde a média de mastócitos foi superior à de linfócitos. Com isso, observa-se que o aumento do número de células T e B, no infiltrado inflamatório de CBC, não determina aumento concomitante do número de mastócitos.

No presente trabalho, em todos os subtipos de CBC existiu uma relação inversa entre as médias de mastócitos e de linfócitos T. Este achado está de acordo com o estudo de Deng e cols (1996) que sugerem que existe uma relação inversa, observada entre o número de mastócitos e o de linfócitos T, em zonas peritumorais de CBC, indicando que estas células seriam a população imune primária que atua no CBC e que a diminuição do número de células T pode estar associada com tumores mais agressivos. Com relação à agressividade, nosso estudo revelou discrepâncias, pois, em tumores com comportamento mais benigno (Cístico) observou-se discreto infiltrado inflamatório envolvendo subpopulações de linfócitos e macrófagos.

O que nos parece mais coerente é pensarmos que cada tipo de tumor cria um micro-ambiente tissular próprio, com características próprias, que induzem respostas inflamatórias diferenciadas. Consequentemente, com relação aos subtipos de CBC, parece-nos razoável sugerir o mesmo, ou seja, cada subtipo possui características próprias, determinadas pelo tipo de alteração genética

induzida para gerar cada forma de CBC. Estas características promoveriam diferenças no micro-ambiente tecidual tumoral, que levaria a alterações na composição do infiltrado inflamatório peritumoral, bem como na liberação dos mediadores inflamatórios que poderiam tanto auxiliar, quanto impedir o crescimento do tumor.

Dentre todos os subtipos de CBC estudados, o morfea foi o que apresentou a maior média de mastócitos na zona peritumoral, superando até a média geral de todos os subtipos e diferindo estatisticamente de todos eles ($p < 0,001$). Quanto ao subtipo com menor concentração de mastócitos no infiltrado inflamatório, observou-se o Folicular. Estes dados corroboram os estudos prévios de Cohen, S. e cols (1995); Erkilic, S. & Erbagci, Z. (2001) e Erbagci, Z. & Erkilic, S. (2002) e são ratificados pelos dados da coloração histológica azul de toluidina.

6.2.5- Proliferação celular (Ki-67)

Neste estudo, a positividade para o antígeno Ki-67 variou, representando no entanto, baixa atividade proliferativa, embora o número médio de células em proliferação, encontrado no CBC, esteja de acordo com o estudo de Abdelsaved e cols (2000), que encontrou média de 51,25.

Outros estudos como os de Healy, E. e cols (1995) e Yerebakan, O. e cols (2003) indicam que um tumor individual não possui um padrão homogêneo de proliferação. Segundo Horlock, N.M. e cols (1997) não há relação entre proliferação e *status* de diferenciação de um tumor, mas a proliferação poderia estar relacionada com a agressividade tumoral. Segundo este mesmo autor, os subtipos infiltrativo e morfea seriam os tumores com mais elevados índices de proliferação, dados comprovados no presente estudo apenas com relação ao subtipo morfea.

Healy, E. e cols (1995) e Yerebakan, O. e cols (2003) encontraram em seus estudos, diferenças no comportamento proliferativo associado ao fator recorrência tumoral; ou seja, em tumores recorrentes, a capacidade proliferativa celular era maior que nos não recorrentes. Entretanto, no presente estudo, este dado não pôde ser avaliado, pois todos os tumores utilizados no estudo eram não-recorrentes.

Barrett, T.L. e cols (1997), através de estudo imunohistoquímico, usando o Ki-67 e p53 como marcadores, nas diferentes variantes histológicas de CBC, encontram diferenças nos padrões de proliferação em cada subtipo do CBC. Segundo os autores, o infiltrativo e o morfea teriam baixa proliferação devido ao elevado índice apoptótico, o contrário do que ocorreria em tumores menos agressivos. Os dados do presente trabalho coincidem com os achados de Barrett, T.L. e cols (1997), pois verificamos que o subtipo infiltrativo tem uma média baixa de células em proliferação; no entanto, discordando dos dados do referido autor, o subtipo morfea (Tabela 9) apresentou a mais alta média de células em proliferação, dados corroborados pelo estudo de Healy, E. e cols (1995) e Horlock, N.M. e cols (1997) onde sugerem que quanto mais agressiva for a forma de CBC, maior o número de células em proliferação.

Com relação ao subtipo infiltrativo, apesar de seu caráter agressivo, este subtipo de CBC apresenta baixo número de células em proliferação (Figura 24). Isto pode ter ocorrido, pois segundo Barrett, T.L. e cols (1997) e Bertheim, U. e cols (2004), existe elevada expressão de p53 neste tipo de tumor, o que poderia explicar a diminuição do número de células em proliferação. Outro fator interessante levantado no trabalho de Bertheim, U. e cols (2004) é que estas discrepâncias na atividade proliferativa, existentes entre os diversos subtipos histológicos de CBC, poderiam estar associadas à liberação de ácido hialurônico no estroma tumoral. Esta liberação induziria modificações no tecido conectivo associado ao tumor, indicando uma forte relação entre as células tumorais e a matriz adjacente.

7- CONCLUSÃO

7- CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo levam-nos às seguintes conclusões:

- 1- O CBC foi mais freqüente na face, em homens, com idade média de 56,9 anos;
- 2- Os padrões mais freqüentes foram o Infiltrativo e o Superficial;
- 3- O CBC apresenta infiltrado inflamatório composto de diferentes tipos celulares localizados principalmente ao redor das "ilhas" tumorais, variando a quantidade de acordo com o subtipo, o que poderia interferir na qualidade da resposta imunológica anti-tumor;
- 4- O denso infiltrado inflamatório peritumoral no CBC consiste, em sua maioria, de linfócitos T CD4⁺, o que sugere uma resposta imunológica localizada mediada por célula;
- 5- Os linfócitos T CD8⁺, macrófagos e linfócitos B têm uma presença mais discreta na resposta anti-tumor do CBC;
- 6- O CBC é um tipo de neoplasia da pele que apresenta baixa atividade proliferativa celular, no entanto em formas mais agressivas, o número de células em proliferação é maior;
- 7- O subtipo Adenóide apresenta o mais denso infiltrado inflamatório dos subtipos de CBC, formado em sua maioria por linfócitos T CD4⁺;
- 8- O subtipo Cístico apresenta o mais pobre infiltrado inflamatório dos subtipos de CBC;

- 9- A coloração pelo azul de toluidina foi tão eficaz quanto a imunohistoquímica na detecção dos mastócitos no infiltrado inflamatório do CBC;
- 10- Os mastócitos correspondem a uma população celular presente no infiltrado de todos os subtipos de CBC, entretanto o Morfea apresenta maior número destas células no infiltrado peritumoral;
- 11- Existe uma relação inversa entre o número de mastócitos e o de linfócitos T, sem correlação com a agressividade;
- 12- As características próprias a cada subtipo talvez possam promover diferenças no micro-ambiente tecidual tumoral, levando a alterações na composição do infiltrado, bem como na liberação de mediadores inflamatórios que poderiam tanto auxiliar, quanto impedir o crescimento do tumor.

8- BIBLIOGRAFIA

8-BIBLIOGRAFIA

ABDELSAVED, R.A.; GUIJARRO-ROJAS, M.; IBRAHIM, N.A. Immunohistochemical evaluation of basal cell carcinoma and trichepithelioma using Bcl-2, Ki-67, PCNA and p53. **J. Cutan Pathol.** 2000; 27: 169-75.

ABDULLAH, N.; GREENMAN, J.; PIMENIDOU, A.; TOPPING, K.P.; MONSON, J.R.T. The role of monocytes and natural killer cells in mediating antibody-dependent lysis of colorectal tumour cells. **Cancer Immunology.** Nov 1999; Vol.48, Nº 9.

ACKELMAN'S et al. **Surgical Pathology.** 1996, 8ª ed., Juan Rosai, pp 113-18.

AL-SARIREH, B. & EREMIN, O. Tumour-associated macrophages (TAMs): disordered function, immune suppression and progressive tumour growth. **J. R. Coll. Surg. Edimb.,** 2000 Feb; 45(1):1-16.

ANANTHASWAMY, H.N. et al. Mechanisms of induction of skin cancer by UV radiation. **Frontiers of Bioscience,** 1997 Nov; 2(1):d538-51.

ANAYA, J.M. Descripción Molecular del TNF- α . **Reumatología.** 2003; 19(2):112-120.

ANICHINI, A. et al. Melanoma cells and normal melanocytes share antigens recognized by HLA A2 restricted cytotoxic T cell clones from melanoma patients. **J. Exp. Med.** 1993; 177:989.

- AOKI, M., PAWANKAR, R., NIIMI, Y. and KAWANA, S. Mast cells in basal cell carcinoma express VEGF, IL-8 and RANTES. **Int. Arch. Allergy Immunol.**, 2003 Mar; 130 (3):216-23.
- ARMSTRONG, B.K. et al. Sun exposure and skin cancer. **Australas J. Dermatol.**, 1997 Jun; 38 Suppl 1:S1-6.
- AUEPEMKIATE, S.; BOONYAPHIPHAT, P.; THONGSUKSAI, P. P53 expression related to the aggressive infiltrate histopathological feature of basal cell carcinoma. **Histopathology**. 2002; 40: 568-73.
- BANDEIRA, A.M.; BANDEIRA, V.; SILVA, J.F.; MAZZA, E. Carcinomas basocelulares: estudo clínico e anatomopatológico de 704 tumores. **An. Bras Dermatol.** 2003 Jan-Fev, 78(1):23-24.
- BALE, A.E. ; YU, K. The Hedgehog pathway and basal cell carcinomas. **Hum Mol Genet.** 2001; 10: 757-62.
- BARRETT, T.L.; SMITH, K.J.; HODGE, J.J.; BUTLER, R.; HALL, F.W.; SKELTON, H.G. Immunohistochemical nuclear staining for p53, PCNA, and Ki-67 in different histologic variants of basal cell carcinoma. **J Am Acad Dermatol.** 1997 Sep;37(3 Pt 1):430-7.
- BASTIAENS MT; HOEFNAGEL JJ; BRUIJN JA; WESTENDORP RG; VERMEER BJ; BOUWES BAVINCK JN. Differences in age, site distribution, and sex between nodular and superficial basal cell carcinoma indicate different types of tumors. **J Invest Dermatol.** 1998 Jun.110(6):880-4.
- BENYON, R.C. The human skin mast cell. **Clin. Exp. Allergy**, 1989 Jul; 19(4):375-87.

- BERTHEIM, U.; HOFER, P.A.; ENGSTROM-LAURENT, A.; HELLSTROM, S. The stromal reaction in basal cell carcinomas. A prerequisite for tumour progression and treatment strategy. **Br J Plast Surg**. 2004 Jul;57(5):429-39.
- BIENENSTOCK, J. et al – Evidence for central and peripheral nervous system interaction with mast cells. In: **Mast cell and basophil differentiation and function in health and disease**. New York: Raven Press, 1989:275-84.
- BLOOM, G.D., A short history of the mast cell. **Acta Otolaryngol Suppl**. 1984; 414: 87-92.
- BOGDAN,C. Nitric oxide and the immune response. **Nat Immunol**. 2001, 2 (10), p. 907-16.
- BOON, T. et al. Tumor antigens recognized by T lymphocytes. **Ann. Ver. Immunol**. 1994; 12:337.
- BOONCHAI, W.; WALSH, M.; CUMMINGS, M. et al. Expression of p53 in arsenic-related and sporadic basal cell carcinoma. **Arch. Dermatol**. 2000; 136: 195-8.
- BOROJEVIC, R. & SERRICELLA, P. **Study of irradiated skin allografts and its use on burnt patients**. Março, 2002. <http://www.anes.fiu.edu/Pro/s7bou.pdf> (Acesso em 19 de outubro de 2006).
- BRADDING, P. et al – Interleukin-4 is localized to and released by human mast cells – **J. Exp. Med**. 1992; 176:1381-85.
- BRADDING, P. & HOLGATE, S.T. Immunopathology and human mast cell cytokines. **Crit. Rev. Oncol. Hematol**. 1999 Jul; 31(2): 119-33.
- BRASILEIRO FILHO, G. **Patologia Geral**. Guanabara Koogan 2ª ed. 1998; 312p.

- BUCHI, D.F. **Efeitos do medicamento homeopático método Canova em camundongos normais e portadores de tumor sarcoma 180.** Maio, 2002. Master Thesis. Departamento de Biologia Celular, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil.
- BURTIN, C. et al. Inverse correlation between tumor incidence and tissue histamine levels in WWV, WV+ e ++ mice. **J. Nac. Cancer Inst.**, 1985; 74:671-74.
- CAMPBELL, C.; QUINN, A.G.; ANGUS, B. et al. The relation between p53 mutation and p53 immunostaining in nonmelanoma skin cancer. **Br. J. Dermatol.** 1993; 129: 235-41.
- CHURCH, M.K. et al. Biological properties of skin mast cells. **Clin. Exp. Allergy**, 1991 May; 21 Suppl 3:1-9.
- CHURCH, M.K. & CLOUGH, G.F. Human skin mast cells: *in vitro* and *in vivo* studies. **Ann. Allergy Immunol.**, 1999 Nov; 83(5):471-5.
- CHURCH, M.K. & LEVI-SHAFFER, F.J., Updates on cells and cytokines. **Allergy Clin. Immunol.**, 1997; 99:155-60.
- CH'NG, S., WALLIS, R.A., YUAN, L., DAVIS, P.F., TAN, S.T. Mast cells and cutaneous malignancies. **Mod. Pathol.** 2006 Jan; 19(1):149-59.
- CLAUDATUS, J.C.JR et al. Skin tumours and reactive cellular infiltrate: further studies. **Acta Derm. Venereol.** 1986; 66(1):29-34.
- CLEAVER, J.E. & KRAEMER, K.H. Xeroderma pigmentosum. In: **The metabolic basis of inherited disease.** Vol. II New York: McGraw-Hill, 1989; 2949-71.

- COHEN, M.S. & ROGERS, G.S. The significance of mast cell in basal cell carcinoma. **J. Am. Acad. Dermatol.** 1995 Sept.; 33 (3): 514-17.
- COTTON, J. & SPANDAU, D.F. Ultraviolet B-radiation dose influences the induction of apoptosis and p53 in human keratinocytes. **Radiation Res.** 1997; 147:148-55.
- CSABA, G. et al. Genesis and function of mast cells. Mast cells and plasmatic reaction to induced homologous and heterologous tumours. **Br. J. Cancer.** 1961; 15:327-35.
- DABBOUS, M. et al. Host-mediated effectors of tumor invasion: role of mast cells in matrix degradation. **Clin. Expl. Metastasis.** 1986; 4:141-52.
- DABBOUS, M. et al. Mast cell modulation of tumour cell proliferation in rat mammary adenocarcinoma. **Br. J. Cancer.** 1991; 63:873-78.
- DE CIDRE, L. & SACERDOTE DE LUSTIG, E. Mast cell kinetics during tumor growth. **Tumor Biol.** 1990; 11(4):196-201.
- DE CIDRE, L.L. et al. Influence of mast cells on two murine mammary adenocarcinomas. **Tumour Biol.** 1996; 17(6):345-53.
- DENG, J.J.; BROD, B.A.; SAITO, R.; THARP, M.D. Immune-associated cells in basal cell carcinomas of skin. **J. Cutan. Pathol.** 1996 Apr; 23(2):140-6.
- DENG, J.S.; FALO, L.D. JR; KIM, B.; ABELL, E. Cytotoxic T cells in basal cell carcinomas of skin. **Am J Dermatopathol.** 1998 Apr;20(2):143-6.
- DE ROMAÑA,F.N.; GRADOS,G.B.; LEÓN, A.S. Lesiones displásicas y neoplásicas de la epidermis t su relación com lãs radiaciones actínicas. Estúdio clínico-patológico multicéntrico,

Lima, Julio 97- Junio 99. **Dermatologia Peruana**. 2002, Enero – Junio, Vol. 12
Nº 1.

DETHLEFSEN, S.M. et al. Mast cell accumulation at sites of murine tumor implantation: Implications for angiogenesis and tumor metastasis. **Invasion Metastasis**. 1994-95; 14(1-6):395-408.

DIEPGEN, T.I. & MAHLER, V. The epidemiology of the skin cancer. **Br. J. Dermatol**. 2002; 146(61):1-6.

DIMITRIADOU, V. & KOUTSILIERIS, M. Mast cell-tumor cell interactions: for or against tumor growth and metastasis? **Anticancer Res**. 1997; 17:1541-50.

DISIS, M.L. & CHEEVER, M.A. Oncogenic proteins as tumor antigens. **Curr. Opin. Immunol**.1996; 8:637-42.

DUNKAN, L.M., et al. Increased mast cell density in invasive melanoma. **J. Cutan. Pathol**. 1998 Jan; 25(1):11-5.

DVORAK, A.M. et al. Tumor-basophil interactions *in vitro* – a scanning and transmission electron microscopic study. **J. Immunol**. 1979; 122:2447-57.

ERBAGCI, Z & ERKILIC, S. Can smoking and/or occupational UV exposure have any role in the development of the morpheaform basal cell carcinoma? A critical role for peritumoral mast cells. **Int. J. Dermatol**. 2002 May; 41(5): 275-8.

ERKILIC, S & ERBAGCI, Z. The significance of mast cells associated with basal cell carcinoma. **J. Dermatol**. 2001 Jun; 28(6): 312-15.

- ERNST, T.M. & MULLER-MAI, C. Immunophenotyping and morphometry os inflammatory infiltrates in variants of Basalioma. **Z Hautkr.** 1987, Aug. 62(15): 1134, 1137-40.
- FALAUS, A. y MERETHEY, K. Histamine: An early messenger in inflammatory and immune reaction. **Immunology Today.** 1992; 13: 154-156.
- FARIAS, M.G. & CASTRO, S.M. Diagnóstico laboratorial das leucemias linfóides agudas. **J. Brás. Patol. Med. Lab.** Apr. 2004; v. 40, n. 2.
- FARNOUSH, A. & MCKENZIE, I.C. Sequential histological changes and mast cell response in skin during chemically induced carcinogenesis. **J. Pathol.** 1983; 12:300-7.
- FERNÁNDEZ, K.; RODRIGEZ, A.R.; CHÓPITE, M.; LÓPEZ, C. Características Clínicas e Histológicas del Carcinoma Basocelular. **Gac Méd Caracas.** 2003 Oct; v.109 n.4.
- FOLKMAN, J. How is blood vessel growth regulated in normal and neoplastic tissue? **Cancer Res.** 1986; 46:467-73.
- FORONES, N.M.; TANAKA, M.; MACHADO, D. Antígeno Carcinoembrionário elevado e ausência de recorrência na monitorização do câncer colorretal. **Arq. Gastroenterol.** 1998 Abr-Jun; 35(2): 100-3.
- FUMAGALLI, L.A. & BRIVIO, F. Immunotherapy and prognostic factors. **J. Clin. Oncol.** 2006 ,supp1, 24(25), p. 4218-9.
- GALLI, S. J. New insights into "the riddle of mast cells": micro environmental regulation of mast cell development and phenotypic heterogeneity. **Lab. Invest.** 1990; 62:5-33.
- _____ New concepts about the mast cell. **New Eng. Jour. Med.** 1993; 328(4):257-64.

- GALLI, S.J. et al. Cytokine production by mast cells and basophils. **Curr. Opin. Immunol.** 1991; 3:865-72.
- GALLI, S.J., TSAI, M., WERSHIL, B.K., TAM, S.Y., COSTA, J.J. Regulation of mouse and human mast cell development, survival and function by stem cell factor, the ligand for the c-kit receptor. **Int. arch. Allergy Immunol.** 1995; 107: 51-53.
- GLEREAN, A. **Manual de Histologia: Texto e Atlas para os estudantes da área de Saúde.** São Paulo, Ed. Atheneu, 2002, p. 145-153.
- GLOSTER, H. M. & BRODLAND, D.G. The epidemiology of skin cancer. **Dermatol. Surg.** 1996; 22:217-26.
- GOMES, NGLAND. & MILANEZ, M.C. Biologia dos tumores. In: Gomes, R. editor. **Oncologia Básica.** 1997. 1st edition, Rio de Janeiro: Revinter. pp.18-35.
- GORDON, J.R. et al. Mast cells as a source of multifunctional cytokines. **Immunol. Today,** 1990; 11:458-64.
- GORDON, P.M.; COX, N.H.; PATERSON, W.D. et al. Basal cell carcinoma: are early appointments justifiable? **Br. J. Dermatol.** 2000; 142: 446-8.
- GREEN, A. et al. Sun exposure, skin cancers and related skin conditions. **J. Epidemiol.** 1999 Dec; 9(6 Suppl.):7-13.
- GRIMBALDESTON, M.A. et al. High dermal mast cell prevalence is a predisposing factor for basal cell carcinoma in humans. **J. Invest. Dermatol.** 2000; 115(2):317-20.

GRIMBALDESTON, M.A., FINLAY-JONES, J.J. AND HART, P.H. Mast cells in photodamaged skin: what is their role in skin cancer? **Photochem. Photobiol Sci.** 2006 Feb; 5(2):177-83.

GRIMBALDESTON, M.A.; GREEN, A.; DARLINGTON, S.; ROBERTSON, B.O.; MARSHMAN, G.; FINLAY-JONES, J.J.; HART, P.H. Susceptibility to Basal Cell Carcinoma is Associated with High Dermal Mast Cell Prevalence in Non-sun-exposed Skin for an Australian Population **American Society for Photobiology Journal** 2003; 78:633-639,.

GRIMBALDESTON, M.A.; SKOV, L.; BAADSGAARD, O.; SKOV, B.G.; MARSHMAN, G.; FINLAY-JONES, J.J.; HART, P.H. Communications: high dermal mast cell prevalence is a predisposing factor for basal cell carcinoma in humans. **J Invest Dermatol.** 2000, Aug;115(2):317-20

GRIMWOOD, R.E. Immune response to basal cell and squamous cell carcinomas. **Immunol. Ser.** 1989; 46:789-98.

GUIMARÃES, R.E.S.; BECKER, H.M.G.; RIBEIRO, C.A.; CROSSARA, P.F.B.T.; BRUM, L.R.A.; MELO, M.M.O. Malignant melanoma of the sinonasal mucosa: literature review and report of two cases. **Ver. Bras. Otorrinolaringol.** 2003 Jan/Feb; vol. 69, nº 1.

GUNNAR, N., METCALFE, D.D. Aspectos contemporáneos de la biología del mastócito. **Allergy and Asthma Proceedings.** Edición Española, 1996; 5: 3-7.

HABETS, J.M.; TANK, B.; VUZEVSKI, V.D.; VAN REEDE, E.C.; STOLZ, E.; VAN JOOST, T. Characterization of the mononuclear infiltrate in basal cell carcinoma: a predominately T cell-mediated immune response with minor participation of Leu-7+

(natural killer) cells and Leu-14+ (B) cells. **J. Invest. Dermatol.** 1988 Mar; 90(3): 289-92.

HARTVEIT, F. Mast cells and methacromasia in human breast cancer: their occurrence, significance and consequence: a primary report. **J. Pathol.** 1981; 134:7-11.

HEALY, E.; ANGUS, B.; LAWRENCE, C.M.; REES, J.L. Prognostic value of Ki67 antigen expression in basal cell carcinomas. **Br J Dermatol.** 1995 Nov;133(5):737-41.

HELFAND, M. et al. Screening for skin cancer. **Am. J. Prev. Med.** 2001; Vol 20, nº3S, p. 47-58.

HERRERA, E.; SANTOS JUANES, J.; GALACHE, C. En: Tumores Cutáneos. Herrera, E. **Aula Médica.** Madrid. 1999; cap 6: 81-96.

HINES, S. J. et al. Co expression of the c-kit and stem cell factor genes in breast carcinomas. **Cell Growth Differentiation.** 1995; 6:769-79.

HORA, C.; BATISTA, C.V.C.; GUIMARÃES, P.B.; SIQUEIRA, R.; MARTINS, S. Avaliação do conhecimento quanto à prevenção do câncer da pele e sua relação com exposição solar em freqüentadores de academia de ginástica, em Recife. **An. Bras. Dermatol.** 2003 Nov./Dec.; vol.78 no.6

HORLOCK, N.M.; WILSON, G.D.; DALEY, F.M.; RICHMAN, P.I.; SANDERS, R. Cellular proliferation characteristics of basal cell carcinoma: relationship to clinical subtype and histopathology. **Eur. J. Surg. Oncol.** 1997 Jun; 23(3):247-52.

HUMPHREYS, T.R. et al. Mast cells and dendritic cells in basal cell carcinoma stroma. **Dermatol. Surg.** 2000 Mar; 26(3):200-3.

ILLMAN, R.O. Antibodies as cytotoxic therapy. **J. Clin. Oncol.** 1994; 12: 1497.

INCA, Instituto Nacional do Câncer, MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Estimativa da Incidência e Mortalidade por Câncer no Brasil.** Banco de dados. <http://www.inca.gov.br/cancer/epidemiologia/estimativa2003/> (Acesso em 22 de outubro de 2006)

ISHI, PEREIRA, SCHELLINI, MARQUES & PADOVANI. Carcinoma basocelular da pálpebra – fatores relacionados com a recidiva tumoral. **An bras Dermatol.** 2004 jul./ago; 79(4):423-430.

JANEWAY, C.A.Jr & MEDZHITOY, R. Innate immune recognition. **Annu Rev Immunol**, 2002; 20.

JANEWAY, C.A.Jr et al. **Imunobiologia.** 5ªed, Artmed, São Paulo, 2002.

JANOWSKI, P. & STRZELECKI, M. Computer analysis of normal and basal cell carcinoma mast cells. **Med. Sci. Monit.** 2001; 7(2): 260-65.

JIANG, S.B. & SZYFELBEIN, K. **Pathology: Basal Cell Carcinoma.** September, 2005. <http://www.emedicine.com/ent/topic672.htm> (Acesso em 19 de outubro de 2006).

JUNQUEIRA, L.C. & CARNEIRO, J. **Histologia Básica- Pele e Anexos.** 9ª ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1999; 427p.

KAMIMURA, A.; KAMACHI, M.; NISHIHARA, J.; OGURA, S.; ISOBE, H. et al. Intracellular distribution of macrophage migration inhibitory factor predicts the prognosis of patients with adenocarcinoma of the lung. **Cancer.** 2000;89:334-41.

KINET, J-P. The high-affinity receptor for IgE. **Curr. Opin. Immunol.**, 1989; 2:499-505.

KITAMURA, Y. Heterogeneity of mast cells and phenotypic changes between subpopulations. **Annu. Rev. Immunol.** 1989; 7:59-76.

KNUDSEN, T. & JOHANSEN, T. The mast cell. **Ugeskr Laeger.** 1990 Nov 19; 152(47):3516-20.

KOHCHIYAMA A., OKA D. AND UEKI H. Immunohistologic Studies of Squamous Cell Carcinoma: Possible Participation of Leu-7+ (Natural Killer) Cells and Antitumor Effector Cells. **Journal of Investigative Dermatology** 1986; 87, 515-518

KRIPKE, M.L. Immunologic mechanisms in UV radiation carcinogenesis **Adv. Cancer Res.** 1981; 34:69-106.

KRISHNASWAMY, G., KELLEY, J., JOHNSON, D., YOUNGBERG, G., STONE, W., HUANG, S-K., BIEBER, J. and CHI, D.S. The human mast cell: functions in physiology and disease. **Frontiers in Bioscience**, 2001 Sept.; 1; 6: 1109-27.

KURASHIGE, S.; MITSUHASHI, S. Macrophage activities in sarcoma 180 bearing mice and EL4 bearing mice. **Gann.** 1982; v. 73, p.85-90.

LACOUR, J.P. Carcinogenesis of basal cell carcinomas: genetics and molecular mechanisms. **Br. J. Dermatol.** 2002; 146 (s61): 17-9.

LAI, L.; ALAVERDI, N.; MALTAIS, L.; MORSE III, H. C. Mouse cell surface antigens: nomenclature and immunophenotyping. **J. Immunol.** 1998; v. 160, n. 8, p. 3861-8.

- LEENEN, P.J.M.; BRUIJN, M.F.T.R. de; VOERMAN, J.S.A.; CAMPBELL, P.A.; EWIJK, W. Van. Markers of mouse macrophage development detected by monoclonal antibodies. *J. of Immunological Methods*. 1994; v. 174, p. 5-19.
- LEFEL, D.J. The scientific basis skin cancer. **J. Am. Acad. Dermatol.** 2000; 42 (1 pt 2); 18-22.
- LERARIO, A.M.; DE MENDONÇA, B.B.; LIN, C.J. Avanços recentes no conhecimento dos mecanismos moleculares envolvidos na tumorigênese adrenocortical. **Arq Bras Endocrinol Metab** 2005 Oct ;vol.49 no.5
- LEVER, W.F. & SCHAUMBURG-LEVER, G. **Histopatologia da Pele**. Manolle, 7rd ed, 1991; vol.2, pp 476-525.
- LI, C.; SHINTANI, S. ;TERAKADO, N.; NAKASHIRO, KI and HAMAKAWA, H. Infiltration of tumor-associated macrophages in human oral squamous cell carcinoma. **Oncology Reports**. 2002; 9: 1219-1223.
- LICHTENBELD, H.H. et al. Tumour angiogenesis: pathophysiology and clinical significance. **Neth. J. Med.** 1996 Jul; 49(1):42-51.
- LING, G.; AHMADIANA, A.; PERSSON, A.A.; UNDÉN, A.B. et al. PATCHED and p53 gene alterations in sporadic and hereditary basal cell cancer. *Oncogene*. Nov 2001; Vol. 20, nº 53: 7770-78.
- LIOTTA, L.A. & KOHN, E.C. The microenvironment of the tumor-host interface. **Nature**. 2001; 411: 375-9.

- LÓPEZ, R.F.R. & MARTÍNEZ, L.A.D. Características clínicas de los pacientes com carcinoma basocelular: uma série de 305 casos em Bucaramanga. **Méd. Onab.** 2002; 5 (14): 63-7.
- LUNA, L. **Manual of Histologic Staining Methods from the AFIP.** McGraw-Hill, NY, 3rd ed, 1968. pp 162-163.
- MACHADO, P.R.L.; ARAÚJO, M.I.A.S.; CARVALHO, L.; CARVALHO, E.M. Mecanismo de resposta imune às infecções. **An Bras Dermatol.** 2004 Nov-Dez; Vol 79, nº 6.
- MALE, D. et al. **Advanced Immunology.** 3^a ed. Mosby, Turin, Italy, 1997.
- MANTESE, S.A.O.; BERBERT, A. L. C. V.; GOMIDES, M. D.A. Basal cell Carcinoma - Analysis of 300 cases observed in Uberlândia - MG, Brazil. **An. Bras. Dermatol.** Mar./Apr. 2006; vol.81, no.2, p.136-142.
- MARIA, D.A. **Biologia das Respostas Imunes Inespecíficas e Específicas em Tumores Cutâneos.** Instituto Butantan, Laboratório de Imunogenética, São Paulo. Boletim do Grupo Brasileiro de Melanoma, 2002. <http://www.gbm.org.br/gbm/boletim/2002/infor19.aspx> (Acesso em 19 de Outubro de 2006)
- MARSH, D. Immunogenetics of allergic disease. In: **Allergy: principles and practice.** 3rd ed. St. Louis: C.V. Mosby, 1988:94-105.
- MARTINEZ, M.A.R.; FRANCISCO, G.; CABRAL, L.S.; RUIZ, I.R.G.; FESTA NETO, C. Genética molecular aplicada ao câncer cutâneo não melanoma. **An. Bras. Dermatol.** Rio de Janeiro set./out. 2006; v.81 n.5

- MEKORI, Y.A. & METCALFE, D.D. Mast cell-T cell interactions. **J. Allergy Clin Immunol.** 1999; 104(3): p. 517-23.
- METCALFE, D.D., BARAM, D. and MEKORI, A. Mast cells. **Physiol. Rev.** 1997; 77: 1033-79.
- MOORE MB, KURAGO ZB, FULLENKAMP CA, LUTZ CT. Squamous cell carcinoma cells differentially stimulate NK cell effector functions: the role of IL-18. **Cancer Immunol Immunother.** 2003 Feb;52(2):107-15.
- MOTA, I. The mast cell revisited. **Braz. Jour. Med. Biol. Res.** 1995; 28:895-901.
- MOZZANICA, N.; CATTANEO, A.; BONESCHI, V.; BRAMBILLA, L.; MELOTTI, E.; FINZI, E.F. Immunohistological evaluation os basal cell carcinoma immunoinfiltrate during intralesional treatment with alpha 2-interferon. **Ach. Dermatol. Res.** 1990; 282(5): 311-7.
- NAGATA, H., WOROBEC, A.S., SEMERE, T. and METCALFE, D.D. Elevated expression of the proto-oncogene c-kit in patients with mastocytosis. **Leukemia.** 1998; 12:175-78.
- NAKAMURA, K. et al. Enhancement of fibroblast dependent of mast cell growth in mice by a conditioned medium of keratinocyte-derived squamous cell carcinoma cells. **Arch. Dermatol. Res.** 1994; 287:91-6.
- NASSER, N. Epidemiology of basal cell carcinomas in Blumenau, SC, Brazil, from 1980 to 1999. **An. Bras. Dermatol.** July/Aug. 2005; vol.80, no.4, p.363-368.
- NATHAN, C. & SHILOH, M.U. Reactiva oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between hosts and microbial pathogens. **Proc. Natl Acad Sci USA,** 2000; 97(16): p. 8841-8.

- NAVARRETE, N. & ZEMELMAN, V. ¿ Existe um patón inflamatório asociado a Carcinoma Basocelular? **Rev. Hosp. Clin. Univ. Chile.** 2001; Vol 12, nº 1, p. 46.
- NAYLOR, M.E. melanoma vaccines. **Dermatology Online Journal.** 6 (1): 5, 2000 (Acesso em 16 de outubro de 2006).
- NISHIMORI, Y. et al. Degenerative alterations of dermal collagen fiber bundles in photodamaged human skin and UV-irradiated hairless mouse skin: possible effect on decreasing skin mechanical properties and appearance of wrinkles. **J. Invest. Dermatol.** 2001; Vol 117, nº6, p.1458.
- NUNES, L.O. **Estudo do Carcinoma Basocelular ex vivo por espectroscopia FT-RAMAN.** Dissertação de Mestrado, Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, SP, 2003.
- OCHI, H. et al. IL-4 and -5 prime human mast cells for different profiles of IgE-dependent cytokine production. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 2000; 97: 10509-513.
- OLIVEIRA, E.A. & SELL, A.M. Os antígenos HLA e a hemoterapia. **Acta Scientiarum.** 2002; vol 24, nº 3: pp. 731-36.
- OSSA, J.E. El factor de necrosis de los tumores o caquectina. **IATREIA.** 1988; vol 1, No.2/DIC.
- OWEN M.R. & SHERRAT, J.A. Modelling the macrophage invasion of tumours: effects on growth and composition **J. Math. Appl. Med. Biol.**, 1998 Jun; 15(2):165-85.
- PEOPLES, G.E. et al. Breast and ovarians cancer-specific cytotoxic T lymphocytes recognize the same HER2/neu-derived peptide. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA.** 1995; 92: 432.

PONDER, B.A. Cancer genetics. **Nature**. 2001; 411: 336-41.

PUIZINA-IVIĆ, N.; MATOKOVIĆ, B.; GLUNČIĆ, I.; MASLOVARA, S. VELA-LJUBIĆ, J.
Histopathologic Variants of Basal Cell Carcinoma correlation with sex, age and
localization. **Journal of Medical Systems**. 1999 October; Vol 23 (5): p. 389 –
400.

QUEIROZ, S.L. & BATISTA, A.A. Funções biológicas do óxido nítrico. **Quím. Nova**. 1999
jun/ago; v.22, n 4.

RABENHORST, S.H.; BURINI, R.C.; SCHMITT, F.C. Marcadores da Proliferação celular. **Rev Bras
Patol Clin**. 1993 jun-mar; 29(1): 24-9.

RAMOS E SILVA, M. Carcinogênese no câncer de pele. **Dermatol. Atual**. 2000; 6(2): 13-17.

RESTIFO, N.P. et al. Identification of human cancers deficient in antigen processing. **J. Exp.
Med**. 1993; 177:265.

RIBATTI, D. et al. The role of mast cells in tumor angiogenesis. **Br. J. Hematol**. 2001; 115(3):
p. 514-21.

RIPPEY, J.J. Why classify basal cell carcinomas? **Histopathology**. 1998; 32: 393-8.

ROBERTS, I.S.& BRENCHLEY, P.E. Mast cells: the forgotten cells of renal fibrosis. **J. Clin.
Pathol**. 2000 Nov; 53(11): 858-62.

ROBBINS, P.F. & KAWAKAMI, Y. Human tumor antigens recognized by T cells. **Curr. Opin.
Immunol**. 1996; 8: 628-36.

- ROBBINS, S.L., KUMAR, V. and COTRAN, R.S. **Pathologic Basis of Disease.** 5rd ed. Philadelphia, Saunders Company, 1994.; pp: 1187.
- ROCHE, W.R. The nature and significance of tumor-associated mast cells **J. Pathol.**, 1986 Feb; 148(2): 175-82.
- RODALLEC, M.; VILGRAIN, V.; COUVELARD, A.; RUFAT, P.; O'TOOLE, D.; BARRAU. V.; SAUVANET. A.; RUSZNIEWSKI P.; MENU, Y. Endocrine Pancreatic Tumours and Helical CT: Contrast Enhancement Is Correlated with Microvascular Density, Histoprognostic Factors and Survival. **Pancreatology** 2006;6:77-85.
- ROHRBACH, J. M.; STIEMER, R.; MAYER, A.; RIEDINGER, C.; DUIJVESTIJJN, A.; ZIERHUT, M. Immunology and growth characteristics of ocular basal cell carcinoma. **Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology.** 2001/ January; Volume 239, Number 1.
- ROSAI, J. **Surgical Pathology.** 9rd ed. Mosby, 2004. pp: 113-18.
- ROSENBERG, S.A. Progress in human tumor immunology and immunotherapy. **Nature.** 2001; 411: 380-84.
- SALDANHA, G. The Hedgehog signaling pathway and cancer. **J. Pathol.** 2001; 193: 427-32.
- SALGUEIRO, M.I.C.P.; COSTA, M.O.R.; VAZ, F.A.C. Estado Imunológico e mecanismos de defesa anti-infecciosa do recém nascido pré-termo. **Pediatria.** São Paulo, 2000; 22(1):68-77.

- SALMÚN, N., JOSVIACK, D.; ROSTAN, M. y PAULIN, P. Papel de la triptasa en el diagnóstico de la rinitis. **Archivos Argentinos Alergia e Inmunología Clínica**. 1994; 25: 217-18.
- SANCHES, J.A.; DE MORICZ, C.Z.M.; FESTA NETO, C. Processos linfoproliferativos da pele. Parte 2 - linfomas cutâneos de células T e de células NK. **An. Bras. Dermatol**. 2006 Jan./Feb; vol.81 no.1.
- SARRÓ, D.V., **Estúdio de los efectos de la aplicación tópica de Imiquimod al 5% em la apoptosis del Carcinoma Basocelular**. Tesis Doctoral, Universitat Autònoma de Barcelona, May- 2003.
- SATO D.Y.; WAL. R.; DE OLIVEIRA, C.C.; CATTANEO, R.I.; MALVEZZI, M.; GABARDO, J.; BUCHI, D.F. Histopathological and immunophenotyping studies on normal and sarcoma 180-bearing mice treated with a complex homeopathic medication. **Homeopathy**. 2005 Jan;94(1):26-32.
- SCHARDENDORF, D. et al. Mast cells in melanocytic tumors **Arch. Dermatol. Res**. 1995; 287(5):452-6.
- SCHREIBER, H. Tumor immunology. In: PAUL, W. (ed) Fundamental immunology. 4. ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1999. p. 1237-1270.
- SCRIVENER, Y.; GROSSHANS, F.; CRIBIER, B. Variations of basal cell carcinomas according to gender, age, location and histopathological subtype. **Br. J. Dermatol**. 2002; 147: 41-7.
- SCHWARTZ, L.B. Heterogeneity of mast cells in human. In: **Mast cell and basophil differentiation and function in health and disease**. New York: Raven Press, 1989: 93-105.

- SCHWARTZ, L.B. Mediators of human mast cells and human mast cell subsets. **Annals of Allergy.** 1987; 58:226-35.
- SCHWARTZ, L.B. The Mast Cell. **In Textbook of Rheumatology.** Philadelphia: W.B. Saunders Company. 1998: 161-75.
- SCHWARTZ, L.B. & AUSTEN, K.F. Structure and function of the chemical mediators of mast cells. **Prog. Allergy.** 1984; 34:271-321.
- SCHWARTZ, L.B. et al. The major enzymes of human mast cell secretory granules. **Am. Rev. Resp. Dis.** 1987; 135:186-9.
- SCHWARTZ, L.B., IRANI, A.M., ROLLER, K., CASTELLS, M.C. and SCHECHTER, N.M. Quantitation of histamine, tryptase and chymase in dispersed human T and TC mast cells. **J. Immunol.** 1987; 138: 2611-15.
- SCRIVENER Y; GROSSHANS E; CRIBIER B. Variations of basal cell carcinomas according to gender, age, location and histopathological subtype. **Br J Dermatol.** 2002 Jul; 147(1):41-7.
- SLATER, D.N.; MCKEE, P.H. Minimum Dataset for the Histopathological Reporting of Common Skin Cancers. **The Royal College of Pathologists.** London, 2002; 1-23.
- SMIRNOVA, I.O.; KVETNOI, I.M.; ANICHKOV, N.M.; SMIRNOVA, O.N.; ANTONOVA, I.V. Mast cells in photolesion of the skin and basal cell cancer associated with it. **Arkh Patol.** 2005 Sep-Oct;67(5):26-9.
- STEVENS, R.L. & AUSTEN, K.F. Recent advances in the cellular and molecular biology of mast cells. **Immunol. Today.** 1989; 10:381-6.

- STITES, D.P. et al. **Medical Immunology**. 9^a ed, Appleton & Lange, Connecticut, USA, 1997, p.678-83.
- SYNKOWSKI, D.R.; SCHUSTER, P. ORLANDO, J.C. The immunobiology of basal cell carcinoma: an *in situ* monoclonal antibody study. **Br. J. Dermatol.** 1985 Oct; 113(4): 441-6.
- TAIPALE, J. BEACHY, P.A. The hedgehog and Wnt signalling pathways in cancer. **Nature**. 2001; 411: 349-54.
- TANOOKA, H. et al. Evidence for involvement of mast cells in tumor suppression in mice. **J. Natl. Cancer Inst.** 1982 Dec; 69(6):1305-9.
- THEOHARIDES, T.C. & PIO CONTI. Mast cells: the JEKILL and HYDE of tumor growth. **Trends in Immunology**. 2004 May; vol 25, nº 5.
- THOMAS H, BALKWILL FR. Effects of interferons and other cytokines on tumors in animals: a review. **Pharmacol Ther.** 1991 Dec;52(3):307-30.
- TOLEDO,P.L.; GARCÍA,A.A.; ; SOTO,Y.T.; FIGUEROA,R.M.; PERDOMO,Y.; GARCÍA, I.V. Y ÁVILA, J.P. Evaluación de la capacidad de reconocimiento de los anticuerpos monoclonales conjugados: IOR T3, T4 Y T8. **Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter.** 1999;16(1):62-6.
- TORNALETTI, S. & PFEIFER, G.P. UV damage and repair mechanisms in mammalian cells. **BioEssays**. 1996; 18:221-28.
- TRAN, H.; CHEN, K.; SHUMACK, S. Epidemiology and aetiology of basal cell carcinoma. **British Journal of Dermatology**. Nov 2003; Vol 149 Issue s66:50.

- TRINCHIERI, G. Biology of Natural Killer Cells. **Adv. Immunol.** 1989; V. 47, P. 295-296.
- TSAO, H. Genetics of nonmelanoma skin cancer. **Arch Dermatol.** 2001; 137: 1486-92.
- TURNER, A. et al. Nonhematopoietic tumor cell lines express stem cell factor and display c-kit receptors. **Blood.** 1992; 80:374-81.
- UEDA, T. ; AOZASA, K.; TSUJIMOTO, M.; YOSHIKAWA, H.; KATO, T.; ONO, K.; MATSUMOTO, K. Prognostic significance of mast cells in soft tissue sarcoma. **Cancer.** 1988; 62: 2416-2419.
- UGARTE, J.E.A.; OBAYA, T.R.; LONDIN, V.L.; CALZADO, E.R. Estudio caomparativo de las subpoblaciones de linfócitos T em carcinomas de la piel. **Rev. Cubana Invest. Bioméd.** 1995; V.14, nº1.
- URBAN, J.L. & SCHREIBER, H. Tumor antigens. **Annu. Rev. Immunol.** 1992; 10: 617.
- UROSEVIC, M. & DUMMER, R. Immunotherapy for nonmelanoma skin cancer: does it have a future? **Cancer.** 2002; 94: 477-85.
- VALENT, P. Cytokines involved in growth and differentiation of human basophiles and mast cells. **Exp. Dermatol.** 1995; 4: 255-59.
- VIDRIO, R.M.G. Cáncer de piel. **Ver. Fac. Méd. UNAM**, 2003 Julio-Agosto; Vol 46, nº 4.
- VILLAVICENCIO, E.H.; WALTERHOUSE, D.O.; IANNACCONE, P.M. The sonic hedgehog-patched-gli pathway in human development and disease. **Am. J. Hum. Genet.** 2000; 67: 1047-54.

- VOLTARELLI, J.C. Febre e inflamação. **Medicina Ribeirão Preto**. 1994 Jan/Jun; 27 (2): 7-48.
- VLIAGOFTIS, H., WOROBEK, A.S., SEMERE, T. and METCALFE, D.D. The proto-oncogene c-kit and c-kit ligand in human disease. **J. Allergy Clin. Immunol.** 1997; 100: 435-40.
- WADLER S. The role of interferons in the treatment of solid tumors. **Cancer**. 1992 Aug;70(4 Suppl):949-58.
- WAINSTEIN, A.J.A. & BELFORT, F.A. Conduta para o melanoma cutâneo. **Ver. Col. Bras. Cir.** 2004 May/June; vol 31, nº 3.
- WARD, L.S. Entendendo o Processo Molecular da Tumorigênese. **Arq. Brás. Endocrinol. Metab.** 2002 Aug; Vol 46, nº 4.
- WASSERMAN, S.I. et al. Anaphylaxis. In: **Allergy: principles and practice**. 3rd ed. St. Louis: C.V. Mosby, 1988;1365-76.
- WHITAKER, D. Clinical evaluation of tumors of the skin. In. Thawley et al. **Comprehensive head and neck tumors**. Saunders, 1997.
- WIDGEROW, A.D. & CHRISTOFIDES, T. Morpheic Basal Cell Carcinoma: Transformation Or Original Pathology?. **The Internet Journal of Plastic Surgery**. 2006; Volume 2 Number 2.
- WILLIS, R.A. **The spread of tumors in the human body**. Butterworth & Co, London, 1952.

- WOROBEC, A.S., SEMERE, T., NAGATA, H. and METCALFE, D.D. Clinical correlates of the presence of the Asp816Val c-kit mutation in the peripheral blood mononuclear cells of patients with mastocytosis. **Cancer**.1998; 83: 2120-29.
- WRANKE, R. & LEVY, R. detection of T and B cell antigens with hybridoma monoclonal antibodies. A biotin-avidin horseradish peroxidase method. **J. Histochem. Cytochem.** 1980; 28: 1771-6.
- YANG, M.L. Basal cell carcinoma and mast cells. **Zhonghua Zhong Liu Za Zhi**, 1989 Nov; 11(6):404-6.
- YEREBAKAN, O.; CIFTCIOGLU, M.A., AKKAYA, B.K.; YILMAZ, E. Prognostic value of Ki-67, CD31 and epidermal growth factor receptor expression in basal cell carcinoma. **J Dermatol.** 2003 Jan;30(1):33-41.
- ZAKUT, R. et al. KIT ligand (mast cell growth factor) inhibits the growth of KIT-expressing melanoma cells. **Oncogene.** 1993 Aug; 8(8):2221-9.

9-ANEXO

ANEXO 1: IMUNO-HISTOQUÍMICA: Técnica de complexo Estreptavidina-Biotina-Peroxidase (StreptABC, DAKO®)

As lâminas foram previamente revestidas por solução de silano (APTS - Sigma® A3648) diluído a 4% em acetona. As secções foram submetidas à técnica imunohistoquímica pelo método streptoavidina-biotina-peroxidase (StreptABC, DAKO®). Foram cortadas secções de 5µm e colocadas em lâminas preparadas (estufa por 24 horas à 40°C antes de iniciar a reação). As lâminas foram desparafinizadas (xilol 2x/5min cada), desengorduradas em álcool absoluto (2x/5min cada) e concentrações decrescentes de álcool até serem re-hidratadas com água destilada e transferidas p/ cubeta com PBS (pH 7,6/ 0,16M).

A recuperação antigênica foi realizada em tampão citrato (pH 6,0/ 0,01M) colocado em banho-maria (90°C). Quando a temperatura do tampão coincidia com a do aparelho, as lâminas eram mergulhadas (em cubeta apropriada) e deixadas por 20 min. Após esfriamento, as lâminas foram colocadas em peróxido de hidrogênio (H₂O₂ 10vol) por 25 minutos para o bloqueio da peroxidase endógena. Em relação ao anticorpo anti-mast cell, a recuperação antigênica foi realizada por digestão enzimática com Pronase (1%), como recomenda o fabricante. Outra diferença na técnica ocorreu no tampão citrato para o uso do anticorpo anti Ki-67. Adicionou-se ao referido tampão, Tween (0,2%) pois como este antígeno é nuclear, o detergente aumentaria a permeabilidade da membrana facilitando a marcação.

As lâminas foram lavadas em água destilada e transferidas para uma cubeta com PBS-Tween (pH 7,6/ 0,16M e 0,1% de Tween). As secções foram delimitadas utilizando-se caneta hidrofóbica (DAKO Pen), e recobertas com 100µl/lâmina de cada anticorpo primário, em diluição adequada (Quadro 1), incubando-as "overnight" em geladeira. Após este período, o material foi lavado em PBS-Tween (2x), procedendo-se a incubação com o anticorpo secundário (100µl/lâmina) (para anticorpos monoclonais: Rabbit anti-mouse biotinilado -

para o anticorpo policlonal: Swine anti-rabbit biotinilado), por 30 min à 30° C. As lâminas foram lavadas em PBS-Tween (2x) e foi adicionado o complexo streptoavidina-biotina-peroxidase (100µl/lâmina) previamente diluído, sendo as lâminas posteriormente incubadas por 30 min à 30° C.