



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE MEDICINA TROPICAL
DOUTORADO EM MEDICINA TROPICAL

MECCIE NE MENDES RODRIGUES

**A UVBS, O HPV β E A EXPRESSÃO TLR9 ASSOCIADOS AO CARCINOMA
ESPINOCELULAR NA PELE FOTOEXPOSTA EM ADULTOS E IDOSOS**

RECIFE

2017

MECCIENCE MENDES RODRIGUES

**A UVBS, O HPV β E A EXPRESSÃO TLR9 ASSOCIADOS AO CARCINOMA
ESPINOCELULAR NA PELE FOTOEXPOSTA EM ADULTOS E IDOSOS**

Tese apresentada ao curso de Doutorado em
Medicina Tropical do Centro de Ciências da
Saúde da Universidade Federal de
Pernambuco, para a obtenção do título de
doutora em medicina tropical.

Orientador: Prof^o. Dr. Ricardo Arraes de Alencar Ximenes

RECIFE

2017

Catálogo na Fonte
Bibliotecária: Mônica Uchôa - CRB4-1010

R696u Rodrigues, Mecciene Mendes.
 A UVBS, o HPV Beta e a expressão TLR9 associados ao carcinoma
 espinocelular na pele fotoexposta em adultos e idosos / Mecciene Mendes
 Rodrigues. – 2017.
 165 f.: il.; quad.; 30 cm.

 Orientador: Ricardo Arraes de Alencar Ximenes.
 Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.
 Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical. Recife, 2017.

 Inclui referências e apêndices.

 1. Raios ultravioleta. 2. Betapapillomavirus. 3. Carcinoma de células
 escamosas. 4. Receptor 9 Toll-Like. 5. Reação em cadeia da polimerase. I.
 Ximenes, Ricardo Arraes de Alencar (Orientador). II. Título.

618.9883 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2017-111)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE)

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE (CCS)

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL (PPGMEDTROP)

MECCIENE MENDES RODRIGUES

**A UVBS, O HPV Beta E A EXPRESSÃO TLR9 ASSOCIADOS AO CARCINOMA
ESPINOCELULAR NA PELE FOTOEXPOSTA EM ADULTOS E IDOSOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Medicina Tropical.

Aprovada em: 22/02/2017.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ricardo Arraes de Alencar Ximenes (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Silvia Maria Lucena Montenegro (Examinadora Externa)
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

Prof^a. Dr^a. Angela Cristina Rapela Medeiros (Examinadora Externa)
Universidade de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Márcia Cristina Galvão Teixeira (Examinadora Externa)
Universidade de Pernambuco

Prof. Dr. Paulo Sérgio Ramos de Araújo (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

REITOR

Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Ernani Rodrigues de Carvalho Neto

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Nicodemos Teles de Pontes Filho

COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

Valdênia Maria Oliveira de Souza

VICE-COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

Maria Amélia Vieira Maciel

DOCENTES PERMANENTES

Ana Catarina de Souza Lopes

Ana Lúcia Coutinho Domingues

Célia Maria Machado Barbosa de Castro

Edmundo Pessoa de Almeida Lopes Neto

Fábio André Brayner dos Santos

Heloísa Ramos Lacerda de Melo

Maria Amélia Vieira Maciel

Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho

Marli Tenório Cordeiro

Rejane Pereira Neves

Ricardo Arraes de Alencar Ximenes

Valdênia Maria Oliveira de Souza

Vera Magalhães da Silveira

Vludia Maria Assis Costa

DOCENTES COLABORADORES

Líbia Cristina Rocha Vilela Moura

Virgínia Maria Barros de Lorena

*Aos pacientes do ambulatório de Dermatologia do HCP, com gratidão; o trabalho nos tornou
parceiros e amigos*

*Aos meus filhos Gabriel e Laura, e, ao meu companheiro, Sílvia Rodrigues, por
representarem todo o amor e solidariedade, e, porque me fazem sentir inteira.
Aos meus pais, Zezita e Pedro, por todo amor, e, exemplos de honestidade e caráter.
A Mécleine, em nome dos meus queridos irmãos, pela torcida e amizade*

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, o Professor Dr. Ricardo Arraes de Alencar Ximenes, pelas orientações na condução do trabalho.

A Dra. Danyelly Bruneska Gondim Martins, e à equipe do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), que possibilitou construção do 1º Artigo, executando, com recursos próprios, a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

A Dra. Leuridan Cavalcante Torres, e à equipe do Laboratório de Pesquisa Translacional do Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira – IMIP – porque possibilitou a construção do 2º Artigo, executando, com recursos próprios, os exames da expressão TLR9.

A equipe da Cirurgia Plástica do Hospital de Câncer de Pernambuco (HCP) em nome do Dr. Armando Cahen, pela disponibilidade em realizar as biópsias nos pacientes da pesquisa.

A equipe do setor de Histopatologia do HCP em nome do Dr. José Roberto Vieira e Melo, pela leitura de todas as lâminas

Ao Professor e grande amigo, o Dr Valdir Bandeira da Silva, com grande estima; meus agradecimentos pela colaboração com sugestões na Histopatologia.

Aos funcionários dos Departamentos de Dermatologia e Cirurgia Plástica do HCP, em nome das funcionárias Maria, Edna, Inalda e Silvania por todo empenho, solidariedade, amizade e adorável convivência, que foram fundamentais para a concretização do trabalho.

A Superintendente de Ensino e Pesquisa do IMIP, a Dra. Afra Suassuna, que, solidariamente, e, entendendo a necessidade do meu afastamento temporário da Instituição, permitiu-o, e, dessa forma tornou possível a concretização do trabalho.

A equipe da Diretoria de Ensino e pesquisa do IMIP, em nome do Professor Dr José Natal, pelos preciosos ensinamentos da bioestatística e pela amizade; às Dras Fátima Caminha, Suely Arruda, Maria do Carmo Duarte, Ana Rodrigues Falbo, Maria Júlia Mello, Jurema Telles, Flávia Orange, Alexsandro Rolland, Ariany Impieri, Patrícia Bezerra, Lygia Carmem, Danielle Menor, Roberto Júnior e Nancy Correa, pela amizade e oportunidade de compartilhar um ambiente de construção de conhecimentos e de solidariedade.

A equipe da Dermatologia do Hospital Otávio de Freitas (HOF), representada pelas Dras. Kátia Oliveira, Patrícia Guimarães e Mecleine Dantas, por terem encaminhado alguns

pacientes, e, às especializandas, Solange Emmanuelle e Theísia Rayol, por terem colaborado na assistência, realização dos testes e na coleta de dados dos pacientes.

A todos os colegas e professores do curso de Medicina da Universidade Federal de Pernambuco – Núcleo de Ciências da Vida – Centro Acadêmico do Agreste – UFPE-CAA-NCV, representados pelos colegas e amigos, Rodrigo Cariri, Izaías Júnior, Carol Paz, Ricardo e Viviane Xavier, Íris Lucas e Saulo Feitosa, que aprovaram meu afastamento em colegiado, porque acreditam no trabalho em equipe pelo enriquecimento e experiências vividas por cada um.

A todos os professores do Departamento de Medicina Tropical - UFPE pelos valiosos ensinamentos na construção do Projeto de Tese.

Aos funcionários do Departamento de Medicina Tropical – UFPE, aqui representados pelo funcionário Walter Galdino, com quem tive a oportunidade de conviver por ocasião do Mestrado e, agora, por ocasião do Doutorado, por sua dedicação, amizade e preciosas dicas, fundamentais no transcorrer do nosso trabalho.

A diretoria do Hospital de Câncer de Pernambuco (HCP), aqui representados pelos Drs. Hélio Fonseca, Fábio Malta e José Peixoto e ao ex-diretor, o Dr José Iran pela oportunidade da execução da Tese no HCP, pela colaboração e tolerância diante da implantação de um projeto de pesquisa em ambiente da assistência médica com grande demanda.

Ao grande amigo o Dr. Alzírton de Lira Freire pelo incentivo e pelas valiosas sugestões no trabalho final.

Ao Dr Emmanuel França pela pronta disponibilidade em ajudar, e, por colocar à nossa disposição a fonte de Radiação Ultravioleta B, para a realização dos testes de UVBS.

Aos colegas da 13ª turma de Doutorado em medicina Tropical, aqui representados pelas colegas Dayse Vasconcelos e Andréa Dória, pela amizade e pelas colaborações na construção da Tese.

"A ambição da ciência não é abrir a porta do saber infinito, mas pôr um limite ao erro infinito"

"Há homens que lutam um dia e são bons, há outros que lutam um ano e são melhores, há os que lutam muitos anos e são muito bons. Mas há os que lutam toda a vida e estes são imprescindíveis".

Bertolt Brecht

RESUMO

A UVBSuscetibilidade é fator de risco de Carcinoma Espinocelular em pele fotoexposta. O HPVBeta associa-se ao Carcinoma Espinocelular em pele fotoexposta de imunossuprimidos, e, em não imunossuprimidos, há relatos, necessitando-se confirmação da associação, e, quais os fatores facilitadores da infecção e persistência do HPVBeta no Carcinoma Espinocelular em pele fotoexposta de adultos e idosos. Os mecanismos de imunossupressão pela exposição à Radiação Ultravioleta B necessitam esclarecimentos, porém, sabe-se que, a exposição leva à produção de padrões moleculares associados ao dano, reconhecidos pelos Toll Like Receptors 9. Os Toll Like Receptors 9 são receptores transmembrana, importantes na imunidade inata à oncogênese, não havendo estudos sobre os Toll Like Receptors 9 no Carcinoma Espinocelular em pele fotoexposta. Na Tese, portanto, verificamos a UVBSuscetibilidade e o HPVBeta no Carcinoma Espinocelular em pele fotoexposta de Adultos e idosos, cujo produto é o Artigo 1. Desenho do estudo: Caso-controle. A UVBSuscetibilidade e a Expressão Toll Like Receptors 9 no Carcinoma Espinocelular em pele fotoexposta de adultos e idosos, cujo produto é o Artigo 2. Desenho do Estudo: Caso-Controle (Subamostra do Artigo 1). O estudo foi realizado com a colaboração dos pacientes diagnosticados com Carcinoma Espinocelular no ambulatório de Dermatologia do Hospital de Câncer de Pernambuco, entre agosto de 2014 e novembro de 2016. Realizou-se a Dermatoscopia e biópsia por exérese e diagnóstico histopatológico da lesão; escarificação de lesões de Carcinoma Espinocelular, de pele espelho da lesão, e, em dorso de punho e mão esquerda, nos pacientes com Carcinoma Espinocelular e nos Controles. A Reação em Cadeia da Polimerase e identificação do HPVBeta; Teste de contato com a Difenciprona em área de pele previamente irradiada (24 horas) para classificação dos pacientes em UVBSuscetíveis e UVBResistentes. Citometria de fluxo e verificação da Média de Intensidade de Fluorescência da Expressão Toll Like Receptors 9 em Leucócitos e Linfócitos Totais, Linfócitos CD20, Granulócitos e Monócitos, em sangue periférico. Resultados: Foram associados ao Carcinoma Espinocelular em pele fotoexposta de adultos e idosos: UVBSuscetibilidade (OR 3,69 IC 1,01 – 13,5); ao menos, um subtipo de HPVBeta (OR 9,38 IC 0,46 – 189,5); Fotoreatividades I e II da classificação de Fitzpatrick (OR 40,2 IC 9,34 – 172,9); Queimadura solar antes dos 20 anos (OR 7,95 IC 1,34 – 47,1); 60 anos ou mais (OR 1,11 IC 1,05 – 1,17); Sexo Masculino (OR 9,35 IC 2,26 – 38,8). A Média de Intensidade de Fluorescência da Expressão Toll Like Receptors 9 em linfócitos totais estava diminuída nos pacientes com Carcinoma Espinocelular comparado aos controles ($p<0.04$), e, em leucócitos totais, linfócitos totais e células B nos pacientes UVBSuscetíveis comparados aos UVB-Resistentes ($p<0.01$, 0,004 e 0,01, respectivamente). Conclusão: A UVBSuscetibilidade e o HPVBeta associaram-se ao Carcinoma Espinocelular em pele fotoexposta de adultos e idosos. A deficiência na Expressão Toll Like Receptors 9 constituiu-se em fator de imunossupressão da imunidade inata em UVBSuscetíveis e no Carcinoma Espinocelular em pele fotoexposta de adultos e idosos. Faz-se necessário a reprodução deste estudo com número maior de participantes.

Palavras-Chave: Raios Ultravioleta. Betapapillomavirus. Carcinoma de Células Escamosas. Receptor 9 Toll-Like. Reação em Cadeia da Polimerase. Citometria de Fluxo.

ABSTRACT

UVB susceptibility is a risk factor for squamous cell carcinoma of photo-exposed skin. HPV- β is associated with squamous cell carcinoma of photo-exposed skin in immunosuppressed and in non-immunosuppressed patients there are reports needing confirmation on whether there is association and the factors that facilitate the infection and persistence of HPV- β in squamous cell carcinoma on photo-exposed skin of adults and older people. The mechanisms of immunosuppression through exposure to UVB require clarification, since it is known that exposure leads to the production of damage-associated molecular patterns, recognized by toll-like receptors 9. The TLR9 are transmembrane receptors, and important in the innate immune system. There have been no studies regarding the role of TLR9 in squamous cell carcinoma on photo-exposed skin. Thus, in this thesis we investigated UVB susceptibility and HPV- β in squamous cell carcinoma on the photo-exposed skin of adults and older people, which is the product of Article 1. Study design: Case-control. The TLR9 expression and UVB susceptibility in squamous cell carcinoma in photo-exposed skin of adults and older people, the product of which is Article 2. Study Design: Case-Control (Subsample of Article 1). The study was performed with the collaboration of patients diagnosed with squamous cell carcinoma at the Dermatology Outpatient Clinic at the Hospital de Câncer de Pernambuco, between August 2014 and November 2016. We performed the dermatoscopy, and the biopsy was performed by excision and histopathological diagnosis of the lesion; a squamous cell carcinoma lesion scraping, skin mirror lesion, and on the back of the wrist and hand in patients with squamous cell carcinoma, and in the control patients. We conducted a Polymerase Chain Reaction and HPV- β identification; a diphencyprone contact test on a previously irradiated skin area (24 hours) and classified UVB susceptibility and UVB-resistant patients. Flow cytometry was performed and the mean fluorescence intensity of the TLR9 expression was investigated in total leukocytes and lymphocytes, CD20 lymphocytes, granulocytes and monocytes in peripheral blood. Results: The following were associated with squamous cell carcinoma on the photo-exposed skin in adults and older people: UVB susceptibility (OR 3.69 CI 1.01 - 13.5); at least one subtype of HPV- β (OR 9.38 CI 0.46 - 189.5), photo-reactivity I and II of the Fitzpatrick classification (OR 40.2 CI 9.34 - 172.9); sunburn before 20 years (OR 7.95 CI 1.34 - 47.1); 60 years or older (OR 1.11 CI 1.05 - 1.17) and male (OR 9.35 CI 2.26 - 38.8). The mean fluorescence intensity of the TLR9 expression in total lymphocytes was lower in patients with squamous cell carcinoma when compared to the controls ($p < 0.04$), and also in the total leukocytes, total lymphocytes and B cells in UVB susceptibility patients compared to UVBr ($p < 0.01$, 0.004 and 0.01, respectively). Conclusion: UVB susceptibility and HPV- β were associated with squamous cell carcinoma in the photo-exposed skin of adults and older people. The deficiency in TLR9 expression was immunosuppressive factor of the innate immune system in UVB susceptibility patients in squamous cell carcinoma of the photo-exposed skin of adults and older people. It is necessary to reproduce this study with a larger number of participants.

Keywords: Ultraviolet B radiation. Betapapillomavirus. Squamous cell carcinoma. Toll-Like Receptor 9. Polymerase Chain Reaction. Flow cytometry.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1 - Estudos selecionados avaliando a presença do HPV em pele normal, em imunocompetentes e imunossuprimidos, com ou sem história de câncer de pele, através da escarificação da pele e realização de PCR.	22
Quadro 2 - Estudos selecionados avaliando a presença do HPV em pele normal, em imunocompetentes e imunossuprimidos, com ou sem história de câncer de pele, através de biópsia e PCR.	23
Quadro 3 - Variáveis potenciais fatores de confusão.	30
Quadro 4 - Classificação em UVBS ou UVBR dos Pacientes Casos e Controles.	33
Figura 1 - Fluxograma da Seleção dos Casos e Controles	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

As - arsênico

BHPV – HPV-Beta

CBC - Carcinoma Basocelular

CEC – Carcinoma Espinocelular

C/EBP α - CCAAT/enhancer-binding protein- α

CPNM – Câncer de pele não-melanoma

DAMPS – *Damage-Associated Molecular Patterns*

DAMPS - Padrões Moleculares Associados ao Dano

DEM – Dose Eritematosa Mínima

DNCB – Dinitroclorobenzeno

DPCB – Difenciprona

EV – Epidermodisplasia Verruciforme

FAP PCR – Técnica aplicada para aumentar o espectro de HPV detectáveis para beta, gama, mu e nu PV e para permitir uma amplificação homogeneamente sensível

HPV – *Papillomavirus humano*

HCP – Hospital de Câncer de Pernambuco

HIS – Hibridização *in situ*

HMGB1 - High-mobility group box protein 1

IMC – Imunidade Mediada por Células

IMC – Índice de Massa Corpórea

LC – *Langerhans Cell*

MHC – Major Histocompatibility Complex

MM – Melanoma

NMSC – *Non Melanoma Skin Cancer*

OED - displasia epitelial oral

PAMPS - Padrões Moleculares Patógenos Associados

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PM PCR - PCR para a amplificação de um fragmento de 117 pb da região E1, específica para o HPV Beta

P53 – gen supressor do tumor

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TLR-9 – *Toll-Like Receptor 9*

TNF α – Fator de Necrose Tumoral α

RUVB – Radiação ultravioleta B

UVB - Ultravioleta B

UVBS – Suscetibilidade à Radiação Ultravioleta B

UVBS – *UVB-Susceptibility*

UVBR – Resistência à Radiação Ultravioleta B

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1 A UVB-Suscetibilidade	19
2.2 A Radiação UVB e o HPVBeta	21
2.3 A Expressão TLR 9 no CEC cutâneo	23
2.4 Exposição ao tabaco no CEC	25
2.5 O HPVBeta associado ao arsênico no CEC	25
3 OBJETIVOS	27
3.1 Objetivo geral	27
3.2 Objetivos específicos	27
4 MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1 Desenho do estudo	28
4.2 Critérios de inclusão	28
4.3 Critérios de exclusão para casos e controles	28
4.4 População da pesquisa	29
4.5 Tipo de amostragem e definição do tamanho da amostra	29
4.6 Definição das variáveis	30
4.7 Métodos de coleta e processamento dos dados	32
4.7.1 Pacientes	32
4.7.2 Determinação da DEM	32
4.7.3 Teste de contato em área de dorso previamente irradiada	33
4.7.4 Teste de Suscetibilidade à Radiação Ultravioleta B (UVBS)	33
4.7.5 Dermatoscopia	33
4.7.6 Biópsia cutânea e histopatológico	34
4.7.7 Material para PCR e identificação do HPVBeta	34
4.8 Determinação da Presença do HPVBeta	34
4.8.1 Extração automatizada de DNA	34
4.8.2 Identificação do HPV	35
4.9 Determinação da expressão TLR9	35
4.10 Análise dos dados	37
4.11 Limitações metodológicas do estudo	39

4.11.1 Viés de seleção	40
4.11.2 Viés de informação	41
4.11.3 Confundimento	41
4.12 Riscos ao paciente	42
5 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	43
6 RESULTADOS	44
6.1 Artigo 1 - A UVB-Suscetibilidade e o HPV Beta como fatores de risco para o Carcinoma Espinocelular na Pele Fotoexposta em adultos e idosos	44
6.2 Artigo 2 - A UVB-Suscetibilidade e a Expressão TollLike Receptor 9 no Carcinoma Espinocelular na pele Fotoexposta em Adultos e Idosos	70
7 CONCLUSÃO	87
REFERÊNCIAS	88
APÊNDICE A – ARTIGOS EM INGLÊS	97
APÊNDICE B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	139
APÊNDICE C – QUESTIONÁRIO	144

1 INTRODUÇÃO

Os Cânceres de Pele Não Melanoma (CPNM) são os tumores mais incidentes em caucasianos, correspondendo a cerca de 25% de todos os cânceres, ocorrendo igualmente em ambos os sexos. Os números são bem elevados, e, esperam-se, para o ano de 2016, no Brasil, cerca de 175.760 novos casos de CPNM (80.850 casos novos nos homens e 94.910 nas mulheres). Em Pernambuco a estimativa para o ano de 2016 é de 2.340 novos casos em homens e 2.790 novos casos em mulheres (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2016).

O Hospital de Câncer de PE (HCP) é referência na assistência ao paciente com câncer no Estado, absorvendo cerca de 50% da demanda do Estado e de outros Estados do NE. Em 2014 foram contabilizados 993 novos casos de CPNM registrados no HCP, e, desse total, 311 (31,3%) foram de Carcinoma Espinocelular (CEC), correspondendo a mais do que 20% do total esperado de diagnósticos de CPNM (993), reforçando as estatísticas de crescimento do CEC.

O CEC é, portanto, o segundo câncer em prevalência no grupo dos CPNM, correspondendo a cerca de 20%, e, mais de 90% dos portadores são UVBSuscetíveis (UVBS), contra cerca de 40% da população (YOSHIKAWA; KURIMOTO; STREILEIN, 1992). Em indivíduos UVB-S há déficit da resposta imunológica inata e adaptativa em situação de exposição a doses mínimas de radiação ultravioleta B, de duas vezes a Dose Eritematosa Mínima (DEM), devido à variabilidade genética. Há, às exposições agudas, supressão da imunidade mediada por células (IMC) e da hipersensibilidade de contato (HC), levando ao déficit no reconhecimento de novos antígenos e de memória imunológica e predisposição a algumas infecções por patógenos intracelulares, como o herpes simples recidivante (TAYLOR et al., 1994; VERMEER; STREILEIN, 1990; YOSHIKAWA; STREILEIN, 1990; YOSHIKAWA; KURIMOTO; STREILEIN, 1992) e a hanseníase virchowiana (RODRIGUES et al., 2010). Em UVB-S a exposição crônica e continuada à RUVB tem efeito cumulativo observando-se mutação do gene supressor do tumor, o p53, constituindo-se marcador de risco para o carcinoma espinocelular (CEC) em pele fotoexposta (REBEL, 2012; YOSHIKAWA et al., 1990). Foi observado, mais recentemente, diferenças significantes na expressão do gene p53 associada ao grau de diferenciação do tumor, a expressão p16, em associação ao estadiamento, e, a expressão Ki67 em associação ao estadiamento avançado (MARINESCU et al., 2016). Foram observadas variantes funcionais em IL10, estando a presença de dois

haplótipos de IL10 GC associada a odds ratio aumentado de Carcinoma Basocelular (CBC) e CEC, em grande parte no sexo feminino (WELSH et al., 2011).

Há outros fatores envolvidos e já descritos na etiologia do CEC em pele exposta à RUVB, e, em portadores da desordem autossômica Epidermodisplasia Verruciforme (EV), e, em imunossuprimidos transplantados renais observaram-se as primeiras evidências da associação do HPVBeta ao CEC em pele fotoexposta (HARWOOD et al., 2000). Em imunocompetentes necessita-se confirmação dessa associação (SHAMANIN et al., 1996), e, se na iniciação, ou na iniciação e na evolução do CEC (ALDABAGH et al., 2013), e, esclarecer sobre os fatores associados, como a RUVB (HARWOOD et al., 2004), e, se há associação de subtipos específicos do HPVBeta (CORREA et al., 2017; FORSLUND et al., 2007).

No intuito de contribuir no esclarecimento dos mecanismos imunológicos envolvidos no microambiente tumoral em pele fotoexposta, a Tese teve continuidade no II artigo, propondo-se a identificar a Expressão Toll Like Receptors 9 (TLR-9) em Leucócitos e Linfócitos Totais, Monócitos (CD14), Linfócitos B (CD20) e Granulócitos Neutrófilos em UVBS e no CEC em pele fotoexposta de adultos e idosos. TLR são receptores transmembrana, expressos em células sentinela do sistema imune, como macrófagos, células dendríticas e em células epiteliais, quais sejam os queratinócitos da pele e mucosas oral, gastrointestinal e epitélio de revestimento genital feminino, e, modulam a resposta imune inata. Esses receptores são importantes no reconhecimento de padrões moleculares patógenos associados (PAMPS) e no reconhecimento de padrões moleculares associados ao dano (DAMPS). Uma vez reconhecendo antígenos macromoleculares endógenos e exógenos induzem a liberação de citocinas e quimiocinas que promoverão a apoptose ou a carcinogênese (PRADERE; DAPITO; SCHWABE, 2014). Não há relatos da expressão TLR-9 no CEC em pele fotoexposta de adultos e idosos.

Aventamos a hipótese de que, em UVB-S, haja um déficit na resposta imune inata favorecendo a infecção da pele fotoexposta pelo HPVBeta, e ambas as exposições, a UVBS e o HPVBeta, levem ao CEC de pele expostas à RUVB de adultos e idosos. Portanto, nos propomos a avaliar, no I artigo, se a UVB-S e o HPV-Beta constituem fatores de risco para o CEC em pele fotoexposta de adultos e idosos.

A hipótese, no II artigo, é de que, as células expostas à RUVB sofram o fotodano, constituindo-se os DAMPs, reconhecidos pelos TLR-9 que promoverão a imunomodulação e apoptose ou a carcinogênese na UVBS, e, no CEC, em pele fotoexposta de adultos e idosos.

Portanto, nos propomos a verificar, no II artigo, a expressão TLR 9, em UVB-S, no CECs em pele fotoexpostas e de controles, em sangue periférico, por Citometria de fluxo.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 A UVB-Suscetibilidade

Os seres humanos podem ser separados fenotipicamente em dois grupos distintos denominados UVB- resistentes e UVB-suscetíveis. Esta diferença é evidenciada quando um hapteno sensibilizante é aplicado no sítio de pele previamente irradiada. UVB-Suscetíveis (UVBS) são aqueles que, quando expostos a pequenas doses de RUVB de duas vezes a dose eritematosa mínima (DEM), antes do hapteno, não desenvolvem a dermatite de contato, e, que ocorre em 40% das pessoas. Por outro lado, aqueles que desenvolvem a dermatite de contato, são considerados UVB-resistentes (UVBR), ocorrendo em 60% das pessoas (RAE et al., 1989). A UVB-S tem se mostrado um marcador de risco para algumas condições clínicas como o CBC, o CEC, o herpes simples recidivante (TAYLOR et al, 1994; VERMEER; STREILEIN, 1990; YOSHIKAWA; KURIMOTO; STREILEIN, 1992; YOSHIKAWA; STREILEIN, 1990), a hanseníase Virchowiana (RODRIGUES et al., 2010), e, o Melanoma (NASSER et al., 2010). Em relação à cor de pele e risco de desenvolvimento de câncer cutâneo, a UVB-S funciona como marcador de risco apenas em indivíduos caucasianos provavelmente em decorrência de ausência do efeito protetor da melanina (VERMEER et al., 1991).

O traço de UVBS foi determinado geneticamente e associado ao Complexo Maior de Histocompatibilidade (MHC), localizado no cromossomo 6 no ser humano e no cromossomo 17 do camundongo. Os mecanismos envolvidos na carcinogêneas pela RUVB, entretanto, necessitam ser elucidados, apesar de passados cerca de 50 anos dos primeiros relatos da penetração e danos da RUVB na pele humana, imunossupressão e carcinogênese pela RUVB (FABO; NOONAN, 1983), e, da caracterização das bases genéticas da UVBS (KURIMOTO; 1994; STREILEIN; BERGSTRESSER, 1988; YOSHIKAWA et al., 1990). Já é reconhecida a Expressão do gene supressor de tumores, o p53, em células que sofreram o fotodano ao DNA, e da Expressão do p53 mutado por exposição à RUVB, na indução do CEC (BAADSGAARD, 1991; BARZILAI et al., 2007; REBEL, 2012; ZIEGLER, 1994). Welsh (2011) em um grande estudo populacional de CPNM investigaram o risco associado a variantes funcionais em 10 genes (IL10, IL4, IL4R, TNF, TNFR2, HTR2A, HRH2, IL12B, PTGS2 e HAL) tendo encontrado que a presença de dois haplótipos de IL10 GC associou-se a odds ratios aumentados de CBC e CEC, em grande parte, no sexo feminino. Em outro estudo, Meeran, Punathil e Katiyar (2008) observaram que, os níveis da IL-12 estavam reduzidos e a

resposta inflamatória induzida pela RUVB estava exacerbada na fotocarcinogênese induzida por RUVB. Em geral, a IL12 promove a imunidade mediada por células e a resposta Th1 (ativação de células NK, resposta citotóxica e produção de IFN- γ), e suprime a resposta Th2 e imunidade humoral, dessa forma promovendo a imunidade anti-tumoral (NGIOW; TENG; SMYTH, 2013).

Foi observado a expressão C/EBP α (CCAAT/enhancer-binding protein- α) em pele humana normal exposta à RUVB e níveis deficitários da Expressão C/EBP α e indução de CEC envolvendo alteração do ciclo celular em resposta à RUVB, em modelo animal (THOMPSON et al., 2011). Kim et al. (2012) observaram que, a exposição à RUVB levou a mutações no gene da espécie (Hr) de camundongo do fenótipo sem pelo, SKH-1 e Hr2/2, e provocou ativação descontrolada do NFkB e dos seus efetores, incluindo os reguladores do ciclo celular ciclina D1 e ciclina E, a proteína anti-apoptose Bcl-2 e a proteína pró-inflamatória Cox-2, promovendo o CEC. É relatado que, o NFkB inibe a transcrição do Toll Like Receptor 9 (TLR9), que tem função de ativação da imunidade inata, no sentido da imunidade Th1 e imunidade celular efetiva, ou, pode atuar em sentido da imunidade Th2, favorecendo a oncogênese (PRADERE et al., 2014). Rodrigues et al. (2017), observaram, por citometria de fluxo, medida em sangue periférico, que a Expressão Toll Like Receptor 9 (TLR9), em Linfócitos totais, estava deficiente no CEC em pele fotoexposta de adultos e idosos em comparação aos Controles, e, em UVBS, comparado aos UVBR (Dados submetidos à publicação). Os TLR9 são receptores de superfície celular e citoplasmáticos, expressos em células do sistema imune e em queratinócitos, e, são componentes do sistema imune inato, havendo relatos da implicação desses receptores na carcinogênese em pele não fotoexposta (PRADERE; DAPITO; SCHWABE, 2014). Estes achados somam-se aos já conhecidos mecanismos de imunossupressão por exposição à RUVB, como a implicação do Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α) (VERMEER; STREILEIN, 1990) na imunotolerância evidenciada nas células de Langerhans. As células de Langerhans (LC) reconhecem antígenos e estão envolvidas com a imunidade celular e resposta Th1, sendo importantes no reconhecimento de novos antígenos e de memória imunológica. Em indivíduos UVBS, a radiação ultravioleta B inibe transitoriamente a migração de células de Langerhans da pele fotoexposta, inibindo a indução de hipersensibilidade de contato, com prejuízo no reconhecimento de novos antígenos e na formação de memória imunológica (BACCI; ALARD; STREILEIN, 2001). Foi relatado mais recentemente, entretanto, que a LC tenha participação na oncogênese, estimulando a multiplicação de queratinócitos e a imunidade Th2

e favorecendo o surgimento e crescimento do CEC sob estímulo da RUVB (LEWIS et al., 2015).

2.2 A Radiação UVB e o HPVBeta

A radiação ultravioleta B (RUVB) persiste como um fator de risco ambiental chave no CPNM, e o CEC é o segundo em prevalência no grupo.

As primeiras evidências da participação do HPV na etiologia do CEC ocorreram pela observação em pacientes portadores da desordem genética dermatológica, a epidermodisplasia verruciforme (EV), e, em imunossuprimidos do aumento na incidência de verrugas virais causadas por papilomavírus em pele fotoexposta e o CEC e estudo “in vitro” demonstrou aumento da atividade viral para Papilomavírus humano (HPV) cutâneos após exposição à RUVB (PURDIE et al., 1999).

Para esclarecer o mecanismo pelo qual o HPVBeta leva ao CEC em não imunossuprimidos e não EV, Hafbauer (2015) estudou, em murinos, a tumorigênese da pele conduzida pela proteína E6 do HPV8 e mostrou que, as células que expressam E6 não conseguem detectar e montar uma resposta eficaz para reparar lesões de DNA induzidas por RUVB. Viarisio et al. (2011), desenvolveram modelo de camundongos transgênicos (Tg) que expressavam as oncoproteínas virais E6 e E7 de HPV-Beta 38 na camada basal da epiderme. Estabeleceram duas linhagens independentes de camundongos TG HPV38 E6/E7 e mostraram que, ambos apresentaram uma susceptibilidade aumentada para desenvolver CEC, em comparação com o tipo selvagem destes animais, quando expostos a carcinógenos químicos e à RUVB. Verificaram ainda que, a exposição à RUVB nos animais Tg, promoveu a formação de lesões de pele que se assemelhavam às lesões precursoras de CEC em humanos, a queratose actínica, e posteriormente o CEC. Em contraste, observou-se que camundongos do tipo selvagem não desenvolveram nem queratose actínica nem CEC quando expostos à mesma dose de UV. Aubin et al. (2003), observaram atividades imunossupressoras das proteínas E6 e E7 do HPV que permitiram infecção persistente e o comprometimento da remoção das células imunologicamente danificados por RUV. Para os autores, estes resultados apoiam um papel da infecção por HPV na carcinogênese da pele, como um co-factor em associação com a imunossupressão pela RUV (AUBIN et al., 2003). Outra possibilidade na tumorigênese do HPVBeta, relatada por Pacini (2015) é a desregulação do ciclo celular via Toll Like Receptor 9 (TLR9) pelo HPVBeta 38, pela exposição à RUVB.

Esses estudos dão suporte, do ponto de vista da plausibilidade biológica, da associação do HPV β ao CEC como co-carcinógeno junto à exposição à RUVB. Em UVBS os efeitos da RUVB são observados pela exposição à pequenas doses de RUVB, de duas vezes a DEM, e, postulamos que, nestes indivíduos, que correspondem à 40% da população, haja predisposição à infecção e persistência do HPV β e associação ao CEC em pele fotoexposta.

Em seguida, nos quadros, apresentamos os estudos epidemiológicos, em imunossuprimidos e imunocompetentes, que reforçam essa associação do HPV β ao CEC e do HPV α à pele fotoexposta. Agrupamos os estudos epidemiológicos por escarificação (Quadro 1) ou biópsia de pele (Quadro 2), em todos, a detecção do HPV β se deu por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

Quadro 1 -Estudos selecionados avaliando a presença do HPV em pele normal, em imunocompetentes e imunossuprimidos, com ou sem história de câncer de pele, por PCR aplicada em material de escarificação de pele.

Autores	Amostra	Condição imunológica	Resultados
Antonsson 2003	248 amostras: 50 indivíduos de Bangladesh; Suécia; Etiópia; Zâmbia; E 48 indivíduos de Japão	Imunocompetentes	Prevalência: Bangladesh: 68%; Japão: 54%; Etiópia: 52%, Zâmbia: 42% Suécia: 70%. •Múltiplos genótipos • O mais prevalente foi HPV-5, com prevalência global de 6,5%.
Antonsson, 2003	115 amostras de 38 lactentes e 31 pais	Imunocompetentes	As infecções da pele por HPV são adquiridas na infância por múltiplos tipos de HPV
Hazard, 2006	126 amostras: 42: indivíduos saudáveis; 21: transplantados renais	Imunocompetente e imunossuprimido	IC: A prevalência de HPV: 69% (29/42) no início e de 71% (30/42), no seguimento. Entre os positivos na linha de base, 48% (14/29) tinham uma infecção persistente. IS: 71% (15/21) foram positivas para HPV no início e 90% (19/21) no seguimento. A infecção persistente foi detectada em 33% (5/15).
Chen, 2008	100 indivíduos imunocompetentes: 50 com história de exposição solar freqüente, e, 50 sem história de exposição solar	Imunocompetentes	A prevalência de HPV foi maior em indivíduos fotoexpostos e com história de CPNM ($p = 0,044$ e $p = 0,04$, respectivamente). Indivíduos que usaram óculos de sol tiveram uma menor prevalência de HPV ($p = 0,018$).

Fonte: Adaptado de Aldabagh et al. (2013).

Quadro 2 -Estudos selecionados avaliando a presença do HPV em pele normal, em imunocompetentes e imunossuprimidos, com ou sem história de câncer de pele, por aplicação de PCR em biópsia de pele.

Autores	Casos	Controles	Resultados	Conclusão
Correa RM et al., Argentina 2017	74 CECs	-	31,1% no CEC 43,4% nas AKs HPVBeta foi o mais encontrado, e, em todas CECs e AKs	Ampla espectro de HPVs foram encontrados em vários tipos de lesões (AK, CEC, CBC, BL) Não houve correlação tipo-específica
Asgari 2008	85 CECs (C-C)	95	HPVDNA em lesões (57%) e perilesional (50%). Controles: Pele normal exposta (59%) e pele e não exposta (49%).	Não houve diferença entre casos e controles, mas o HPVBeta 2 foi maior no CEC do que em pele adjacente e controles (OR4,0 IC 1,3 – 12)
Forslund 2007	82 com CEC, 49 com AK		Positividade para HPV DNA em: 12% da amostra de pele saudável, 22% da amostra de ceratose actínica, 26% dos CECs. 42 tipos diferentes de HPV e associação entre a prevalência do HPV e a exposição solar para as lesões e para a amostra de pele saudável Fotoexposta.	A exposição solar extensa é fator de risco para a infecção por HPV cutâneos. Os HPVBeta espécies 2 estão implicados na etiologia do CEC cutâneo.
Harwood -2004 (Inglaterra)	124 amostras de pele exposta e não exposta de 39IC e 38 RTRs, ambos com e sem CPNM		O HPVDNA foi detectado em: - 58/67 (87%) amostras dos Transplantados, e, - 20/57 (35%) amostras de pacientes imunocompetentes.	Não houve diferença na prevalência ou espectro de tipos de HPV encontrados em pele normal exposta e não exposta. Associação significativa entre CPNM e a presença de EV HPV DNA em pele normal
Forslund et al., 2003 (Austrália)			HPV-EV40% nas biópsias de CPNM 61% na reg glútea (p0,04) Perilesional (69%) Glútea (59%). HPV38 em 39% das lesões 43% das AKs e no CEC em 13% (p0,037) HPV92 em 12% de todos os pacientes.	Foram encontrados amplo espectro de HPVBeta a maioria subespécie 1 nos tumores. O subtipo 38 mais na AK
Purdie, 2005			HPV-EV gene transcrito em 4 de 11 (36%) de OTR E 1 de 2 (50%) IC com CEC.	Esses dados mais os epidem provêm razão para a contribuição Do HPV-EV na patogênese do no CEC cutâneo.
Patel, 2008	CEC = 101		Testado para todos os HPVBeta HPVBeta 1 (incluindo 5 e 8) no CEC e comparado ao CBC (p<0,001)	Os dados sugerem para o HPVBeta, no CEC espec espécies 1.

Fonte: Adaptado de Aldabagh et al. (2013).

2.3 A Expressão TLR 9 no CEC cutâneo

Os TLR são receptores de superfície e transmembrana expressos em células sentinelas do sistema imune como Monócitos (CD14+), Linfócitos B (CD20+), macrófagos, células dendríticas e em queratinócitos da pele e mucosas oral, gastrointestinal, pulmonar e epitélio de revestimento genital feminino, e, modulam a resposta imune inata e adaptativa (HUANG et

al., 2005). Esses receptores são integrantes de família de dez já reconhecidos receptores (TLR 1 a 10), importantes no reconhecimento de padrões moleculares associados ao dano (DAMPS) ou Padrões Moleculares Patógenos Associados (PAMPS) (HERNANDEZ; HUEBENER; SCHWABE, 2016).

Num dos mecanismos de ativação da imunidade inata via receptor Toll-like 9 (TLR9) foi identificada a HMGB1 (High mobility group B1 protein) conduzindo a um aumento na secreção de IL-6, IL-12 e TNF α . A HMGB1 se constitui em grupo de proteína de alta mobilidade padrão molecular associado a danos, e, é liberado durante a morte celular necrótica ou secretada a partir de macrófagos activados, células NK e células dendríticas mielóides maduras (IVANOV et al., 2007)

Johnson et al. (2013) observaram que, a exposição aguda à RUVB estimulou a secreção de HMGB1 de queratinócitos humanos em cultura, e, de queratinócitos epidérmicos em pele murina. A secreção de HMGB1 correlacionou-se com a produção de citocinas pró-inflamatórias “in vitro” e infiltração de células inflamatórias “in vivo”. E, em tumores originados em pele murina irradiada cronicamente, a expressão da proteína HMGB1 em papilomas benignos de baixo grau foi semelhante à da pele adjacente, no entanto, observou maior número de células positivas para HMGB1 em papilomas de alto grau e no CEC. Em geral, os dados sugerem que o HMGB1 pode ser um importante regulador da inflamação cutânea induzida por RUV e formação de tumores. Para os autores, estudos adicionais são necessários para avaliar se a segmentação de HMGB1 seria uma estratégia útil para prevenir a formação de tumores em resposta à exposição crônica a RUVB. Popovic (2006) demonstrou que, a HMGB1 suprime a secreção e maturação de citoquinas por PDC (Células Dendríticas Plasmocitóides) em resposta a agonistas TLR9 inibindo a secreção de várias citocinas pró-inflamatórias, incluindo IFN-alfa, IL-6, TNF-alfa, proteína-10 indutível e IL-12. Em resumo, os TLRs regulam respostas inflamatórias e imunes durante a carcinogênese, induzindo mediadores antitumorais, por outro lado, têm sido cada vez mais reconhecidos, também, como reguladores da inflamação e promotores de carcinogênese (PRADERE; DAPITO; SCHWABE, 2014).

Há relatos da Expressão TLR9 em células tumorais no CEC oral (KOTRASHETTI et al., 2013; MIN et al., 2012), de cabeça e pescoço (FRENZEL et al., 2006) esôfago (SHEYHIDIN I, et al., 2011), pulmão (BELMONT L et al., 2014) e cervical (CHEN et al., 2012; GHOSH et al., 2015; KUMAR et al., 2013; LEE et al., 2007).

Kotrashetti et al. (2013), examinou as expressões imunohistoquímicas de TLR4 e TLR9 em vários graus de displasia epitelial oral (DEO), carcinoma oral de células escamosas

(CEC oral) e mucosa oral normal (MON) para determinar a associação entre TLR4 e TLR9 na progressão de lesões de displasia para carcinoma. Os resultados indicaram que o padrão de expressão de TLR4 e TLR9 aumentou significativamente nas displasias leve a grave em relação aos controles e refletiram a progressão de DEO para CEC oral, o que, para os autores, sugeriu que os TLR podem desempenhar um papel na tumorigênese e que poderia ser utilizado como um alvo para a prevenção e terapia do CEC oral no futuro.

Até o presente momento não há pesquisas acerca da Expressão TLR9 na UVBS e no CEC em pele fotoexposta.

2.4 Exposição ao tabaco no CEC

Em coorte de mulheres caucasianas idosas, Henderson et al. (2015) observaram menores probabilidades de CPNM entre as fumantes atuais em comparação com as não-fumantes ao longo da vida. A associação persistiu apesar de controlar por idade, instrução, uso do álcool, as variáveis da exposição ao sol, e outros confundidores potenciais. Uma explicação para as probabilidades mais baixas de CPNM em fumantes atuais pode ser que os indivíduos "predispostos ao câncer" possam sucumbir a outros cânceres em uma idade mais precoce do que o necessário para desenvolver o NMSC e este fato pode mascarar a taxa verdadeira dos cânceres de pele em fumantes (se todos tivessem sobrevivido), e, também, devido ao viés de seleção, relacionado à menor triagem de câncer de pele em fumantes. Observou-se que, menos fumantes atuais tiveram mamografia (78% de fumantes versus 93% de não fumantes, respectivamente), ou colonoscopia (46% dos fumantes atuais vs 56% dos que nunca fumaram) (valor $P < .0001$), similar aos estudos anteriores sobre as taxas de rastreio colorretal. Os fumantes atuais tiveram taxas mais baixas de rastreamento em comparação com os fumantes nunca e passado, apesar de ter um provedor de cuidados atuais e ter seguro. Os autores concluíram que fumar não aumenta o risco de câncer de pele. Os fumantes atuais estão associados a um menor risco de CPNM possivelmente como resultado do viés de detecção relacionado à menor triagem para o câncer de pele.

2.5 O HPV Beta associado ao arsênico no CEC

Avaliou-se a relação entre exposição crônica ao arsênico (As), HPV e CPNM por meio de estudo de caso-controle (42 casos e 48 controles) na Região Lagunera, México, onde a exposição crônica ao As é endêmica. A exposição foi determinada através do histórico

detalhado de residência na área contaminada e medição dos níveis de As na água potável e na urina dos pacientes. A soropositividade para o HPV foi significativa e a OR foi 9.04 ($P = 0.01$) quando a exposição ao As apresentava níveis baixos. A OR aumentou significativamente para 16,5 ($p = 0,001$) quando ambas as exposições, níveis elevados de As e soropositividade para o HPV estavam presentes. Assim, a infecção por HPV mostrou-se um factor de risco adicional para o desenvolvimento de CPNM em seres humanos cronicamente expostos ao As. Os autores propuseram, contudo, mais estudos com populações adicionais para determinar a associação entre a exposição ao HPV e o As no CPNM (ROSALES-CASTILLO et al., 2004).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Verificar a associação entre o HPV beta e o CEC e entre a UVB-S e o CEC.

Comparar a Expressão TLR 9: nos casos CEC e Controles sem CEC; nos UVBS e UVBR.

3.2 Objetivos específicos

- a) Verificar a UVB-S no CEC e em Controles sem CEC;
- b) Identificar o HPV Beta no CEC e em Controles sem CEC;
- c) Comparar a frequência de UVB-S em indivíduos com CEC e em Controles sem CEC;
- d) Verificar a Expressão TLR 9 em casos CEC e controles sem CEC;
- e) Verificar a Expressão TLR 9 em UVBS e em UVBR.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Desenho do estudo

- a) **Artigo 1:** A UVBSuscetibilidade e o HPV Beta como fatores de Risco para o Carcinoma Espinocelular na Pele Fotoexposta em Adultos e idosos.

Trata-se de um estudo do tipo Caso Controle com o objetivo de verificar a associação da UVB-S e do HPV Beta ao CEC em pele fotoexposta de Adultos e Idosos. Serão considerados casos os portadores de lesões de CEC e controles não portadores de CEC;

- b) **Artigo 2:** A UVBSuscetibilidade e a Expressão TollLike Receptor 9 no Carcinoma Espinocelular na pele Fotoexposta em Adultos e Idosos. Subamostra do Artigo 1- Trata-se de estudo do tipo Caso Controle com o objetivo de identificar a associação da Expressão TLR9 em indivíduos com CEC e Controles sem CEC e da associação da Expressão TLR9 em indivíduos UVBS e UVBR.

4.2 Critérios de inclusão

- a) **Para casos e controles:** idade ≥ 18 anos;
- b) **Casos:** ser portador de CEC em pele fotoexposta, atendido no HCP;
- c) **Controles:** pacientes que freqüentaram o mesmo ambulatório do HCP, que não apresentavam lesões de CEC e que não eram parentes consanguíneos de Casos.

4.3 Critérios de exclusão para casos e controles

Todos os critérios abaixo foram verificados através do histórico e do exame clínico, registros nos prontuários ou pesquisados por exames laboratoriais

- a) Presença de outras lesões papilomatosas, verrucosas ou escamo-queratóticas identificadas através do exame clínico de pele e mucosas pela pesquisadora;
- b) Portadores de doenças com comprovada relação com UVB-S como o herpes simples recidivante, hanseníase ou pitiríase versicolor; foi verificada durante a anamnese e busca de registro em prontuário médico;

- c) Portadores de doenças imunossupressoras, em corticoterapia ou uso de outros imunossupressores verificada pela pesquisadora através da anamnese, exame físico, busca de registro em prontuário médico e realização de exames laboratoriais;
- d) Gestantes: será verificada pela pesquisadora através da anamnese e exame laboratorial Beta-HCG;
- e) Pessoas com história de exposição prévia à substância difenciprone, um hipersensibilizante de contato que foi utilizado para a identificação dos indivíduos UVB-S.

4.4 População da pesquisa

Pacientes atendidos na clínica dermatológica do Hospital de Câncer de Pernambuco (HCP), divididos em dois grupos: Casos: foram os pacientes portadores de CPNM, do tipo CEC na pele fotoexposta e os Controles foram os pacientes sem câncer de pele, definido pelos critérios de inclusão e exclusão.

4.5 Tipo de amostragem e definição do tamanho da amostra

Casos e controles foram selecionados no ambulatório de câncer de pele do HCP-Recife-PE entre setembro de 2014 e dezembro de 2016. Para a verificação da associação entre o HPVBeta e o CEC foram considerados: Erro alfa de 5% e erro beta de 20% (power de 80%). A frequência de HPVBeta considerada foi 26% nos pacientes Casos, e, para os controles de 12% (Forslund, 2007): o tamanho da amostra foi inicialmente de 176 casos e 176 controles.

O cálculo do tamanho da amostra foi feito após a realização das PCRs nas primeiras amostras quando foi observado 36,2% de positividade para o HPVBeta nos casos e 1,8% nos Controles, em pele fotoexposta e no CEC em pele fotoexposta, tendo resultado 28 Casos e 28 Controles.

4.6 Definição das variáveis

A definição e categorização das Variáveis independentes sociodemográficas, Variáveis referentes à exposição à Radiação Ultravioleta B e HPV e da variável dependente Carcinoma Espinocelular (Quadro 3).

Quadro 3 - Variáveis potenciais fatores de confusão.

(continua)

VARIÁVEIS SÓCIODEMOGRÁFICAS		
Variáveis independentes	Definição	Categorização
Idade	Anos completos de vida no dia da entrevista, de acordo com a data de nascimento.	< 60 anos ≥ 60 anos
Sexo	Referente ao gênero masculino ou feminino.	Masculino. Feminino
Escolaridade	Referente à aprendizagem escolar em anos completos de estudo.	Zero anos 1 a 8 anos 9 a 11 anos ≥12 anos
Renda familiar	Referente à fonte de renda responsável pelo sustento da família, definida em salário mínimo dos anos 2012/2013.	Menos de 1 salário mínimo 1 a 3 salários mínimos ≥ 4 salários mínimos
VARIÁVEIS REFERENTES À FOTOEXPOSIÇÃO		
Variáveis independentes	Definição	Categorização
Fototipos da classificação de Fitzpatrick		
Muito sensível	Queima com facilidade, nunca bronzeia	I – Branca-Ruiva
Sensível	Queima com facilidade, bronzeia muito pouco	II - Branca
Normal	Queima moderadamente, bronzeia moderadamente	III - Morena Clara
Normal	Queima pouco, bronzeia com facilidade	IV - Morena Moderada
Pouco sensível	Queima raramente, bronzeia bastante	V - Morena Escura
Insensível	Nunca queima, totalmente pigmentada	VI - Negra

Quadro 3 - Variáveis potenciais fatores de confusão.

(Conclusão)

	VARIÁVEIS REFERENTES À FOTOEXPOSIÇÃO	
Variáveis independentes	Definição	Categorização
Nível de exposição ao sol por sítio anatômico (profissional)		
Exposição intensa	Cabeça, pescoço e dorso das mãos.	Categoria I
Exposição moderada	Tronco e extremidades	Categoria II
Suscetibilidade à Radiação Ultravioleta B	São aqueles indivíduos que quando expostos a pequenas doses de RUVB de duas vezes a dose eritematosa mínima (DEM), antes da aplicação do hapteno difenciprone, não desenvolvem a dermatite de contato que seria esperada após a segunda exposição e que ocorre naqueles UVB-resistentes (UVB-R).	UVB-S
Resistência à Radiação Ultravioleta B	São aqueles indivíduos que quando expostos a pequenas doses de RUVB de duas vezes a dose eritematosa mínima (DEM), antes da aplicação do hapteno difenciprone, desenvolvem a dermatite de contato esperada após a segunda exposição e que não ocorre naqueles UVB-suscetíveis (UVB-S).	UVB-R
Variável dependente HPV Beta	Definição	Categorização
HPV BETA	identificada a presença do DNA referente ao HPVbeta através da reação em cadeia da polimerase (PCR)	Sim Não
Variável dependente		
Presença de Carcinoma espinocelular na pele fotoexposta	Definida por critérios clínicos, dermatoscópicos e biópsia com histológico	Com CEC
Ausência de Carcinoma Espinocelular	Ausência de lesões sugestivas de CEC por critérios clínico, dermatoscópico e histológico	Sem CEC

Fonte: A autora.

4.7 Métodos de coleta e processamento dos dados

4.7.1 Pacientes

Os pacientes foram selecionados por ocasião da consulta no ambulatório de Dermatologia do Hospital de Câncer de Pernambuco (HCP), divididos em dois grupos:

Pacientes Casos: foram os pacientes portadores de CPNM, do tipo CEC.

Pacientes Controles: foram os pacientes sem câncer de pele, definido pelos critérios de exclusão.

Após a seleção os pacientes eram comunicados sobre a pesquisa e convidados a participar. Aqueles que aceitaram participar assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CEP-CCS-UFPE) e aprovado sob o CAAE 21971913.7.0000.5208

4.7.2 Determinação da DEM

Para a determinação da DEM foi realizada a exposição à fonte manual de RUVB - UVB Narrow Band- que emite uma radiação ultravioleta com espectro contínuo e pico entre 313 e 317 nm (Aparelho do fabricante Pro Lumina), colocado a 2,5 cm de distância. O tempo de exposição foi expresso como energia por unidade de superfície (KJ/m^2). A área escolhida da superfície corpórea foi a porção não bronzeada do terço inferior do dorso do tronco.

A área de teste foi revestida por uma película foto-opaca, com seis aberturas de 2cm^2 , que foram irradiadas com 3 mJ/m^2 ; $4,5 \text{ mJ/m}^2$; 6 mJ/m^2 ; 9 mJ/m^2 ; 12 mJ/m^2 ; 18 mJ/m^2 ; 24mJ/m^2 ; 36mJ/m^2 . Os quadrados eram fechados de forma progressiva nos tempos correspondentes. Os pacientes foram orientados a evitar a exposição solar durante o período de observação.

A DEM foi definida como o tempo necessário para que houvesse formação de um eritema discreto, com bordas bem definidas e sem formação de bolhas, após exposição única à RUVB, sendo expressa como energia por unidade de superfície (KJ/m^2). Após 16 a 24 horas da exposição foi realizada a leitura do eritema e identificada a DEM.

4.7.3 Teste de contato em área de dorso previamente irradiada

Em área correspondente a duas vezes a DEM era aplicado 0,1ml de difenciprone (DPCB) a 0,05% diluído em acetona e fixado na pele irradiada por um adesivo hipoalergênico, que era removido após 24 horas quando observava-se o efeito irritante primário do sensibilizante.

4.7.4 Teste de Suscetibilidade à Radiação Ultravioleta B (UVBS)

Após 21 a 28 dias da sensibilização com DPCB a 0,05%, foi realizado um teste de contato para verificação da hipersensibilidade de contato ao DPCB diluído a 0,001%, colocado em área não irradiada do dorso em nível da omoplata. A leitura foi realizada após 48 horas da aplicação, sempre pela mesma observadora, que aguardou, pelo menos, 30 minutos após a retirada do adesivo, e a leitura obedeceu aos seguintes critérios:

Quadro 4 - Classificação em UVBS ou UVBR dos Pacientes Casos e Controles.

(-)	Reação negativa;
(+)	Reação fraca = eritema discreto, pouca infiltração, sem vesiculação;
(++)	Reação forte = eritema moderado, pápulas ocasionais, poucas vesículas;
(+++)	Reação muito forte = forte edema e muitas vesículas;
(++++)	Reação extrema = formação de bolhas e ulceração.

Fonte: A autora

Legenda: - Negativa = não reatores: considerados UVBsuscetíveis (UVB-S);

-Positiva = reatores: UVB-resistentes (UVB-R).

4.7.5 Dermatoscopia

Foram utilizados os critérios dermatoscópicos aplicados por Zalaudek et al. (2012).

4.7.6 Biópsia cutânea e histopatológico

Foi realizada com Punch descartável 6mm, precedida por anti-sepsia da área e anestesia local.

Os fragmentos para exame histológico foram fixados em formol a 10%, tamponados para a histologia, e realizou-se a coloração por Hematoxilina-Eosina (HE).

Foram considerados CEC os seguintes achados histopatológicos:

- a) **CEC “in situ”**: presença de queratinócitos atípicos ocupando parte ou toda a epiderme, caracterizados por pleomorfismo nuclear. Presença de hiperqueratose e paraqueratose;
- b) **CEC invasivo**: presença de proliferação de lóbulos e ilhas destacadas de queratinócitos eosinófilos brilhantes contendo núcleo com algum grau de pleomorfismo e mitoses. Nucléolo proeminente e presença de pérolas córneas e células apoptóticas. Presença de invasão representada por ilhas tumorais desconectadas em vários níveis da derme.

4.7.7 Material para PCR e identificação do HPV Beta

Procediam-se à escarificação da lesão suspeita de CEC, da região do corpo espelho da lesão de CEC e de área fotoexposta de punho e dorso de mão, sendo este último, para Casos e Controles. O material era armazenado a menos -80°.

4.8 Determinação da Presença do HPV Beta

4.8.1 Extração automatizada de DNA

As amostras de raspado de pele coletadas foram mantidas em tampão PBS, estocadas a -20°C até serem utilizadas para extração de DNA. O QIASymphony DNA Mini Kit foi utilizado para extração automatizada de DNA através do QIASymphony SP automated system (Qiagen), seguindo as instruções do fabricante. Todas as amostras foram submetidas a uma etapa de digestão com Proteinase K antes de inseridas no sistema para a extração. A concentração do DNA eluído foi avaliada em NanoDrop 2000 (Thermo Scientific™) e posteriormente armazenado a -20°C.

4.8.2 Identificação do HPV

A PM-PCR foi realizado utilizando primers específicos para HPV do grupo beta-papillomavirus, sendo capaz de identificar HPV5, 8, 9, 12, 14, 15, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 36, 37, 38, 47, 49, 75, 76, 80, 93, 96, 104, 110, 111 e 145 (KONING et al., 2006). A análise por PCR foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Koning et al. (2006), com pequenas modificações. A PM-PCR foi preparada para o volume final de 12.5ul contendo 6.25ul GoTaq Green Master Mix (Promega), 1ul do DNA eluído (até 100ng), 10pmoles PM-A (5'-ACTGACCAAAGCTGGAAATC-3') e 10 pmoles PM-D primer (5'-TCTTGCAGAGCATTGAAACG-3'). A reação de PCR foi realizada no MyCycler™ thermal cycler (BioRad), sob a seguinte ciclagem: 95°C por 1 min, seguido de 35 ciclos de 95°C por 30s, 52°C por 45s, e 72°C a 45s; seguido de extensão final a 72°C por 5 min. O fragmento gerado de 117 pb referente à amplificação de uma região do gene E1 do HPV foi observada em agarose 1% preparada em tampão TB e visualizada pela presença do brometo de etídio (10 µg/ml).

A FAP-PCR foi realizado utilizando primers específicos para HPV do grupo beta-papillomavirus, sendo capaz de identificar HPV3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 20, 21, 22, 23, 24, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 36, 37, 38, 39, 42, 43, 45, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 57, 59, 60, 61, 62, 64, 65, 67, 68, 69, 70, 72, 73, 75, 76, 77 e 80 (FORSLUND et al., 1997). A análise por PCR foi realizada de acordo com Koning et al. (2006), com pequenas modificações. A FAP-PCR foi preparada para o volume final de 12.5ul contendo 6.25ul GoTaq Green Master Mix (Promega), 1ul do DNA eluído (até 100ng), 10pmoles FAP59 (5'-TAACWGTIGGICAYCCWTATT-3') e 10pmoles FAP64 (5'-CCWATATCWWHCATITCICCATC-3'). A PCR foi realizada utilizando o Veriti™ Thermal Cycler (Applied Biosystems™), com os seguintes parâmetros: 5 min a 95°C; 45 ciclos de 1 min a 95°C, 60s a 50°C e 60s a 72°C, seguido de extensão final por 5 min a 72°C. O fragmento gerado de 478pb pb referente à amplificação de uma região do gene E1 do HPV foi observada em agarose 1% preparada em tampão TB e visualizada pela presença do brometo de etídio (10 µg/ml).

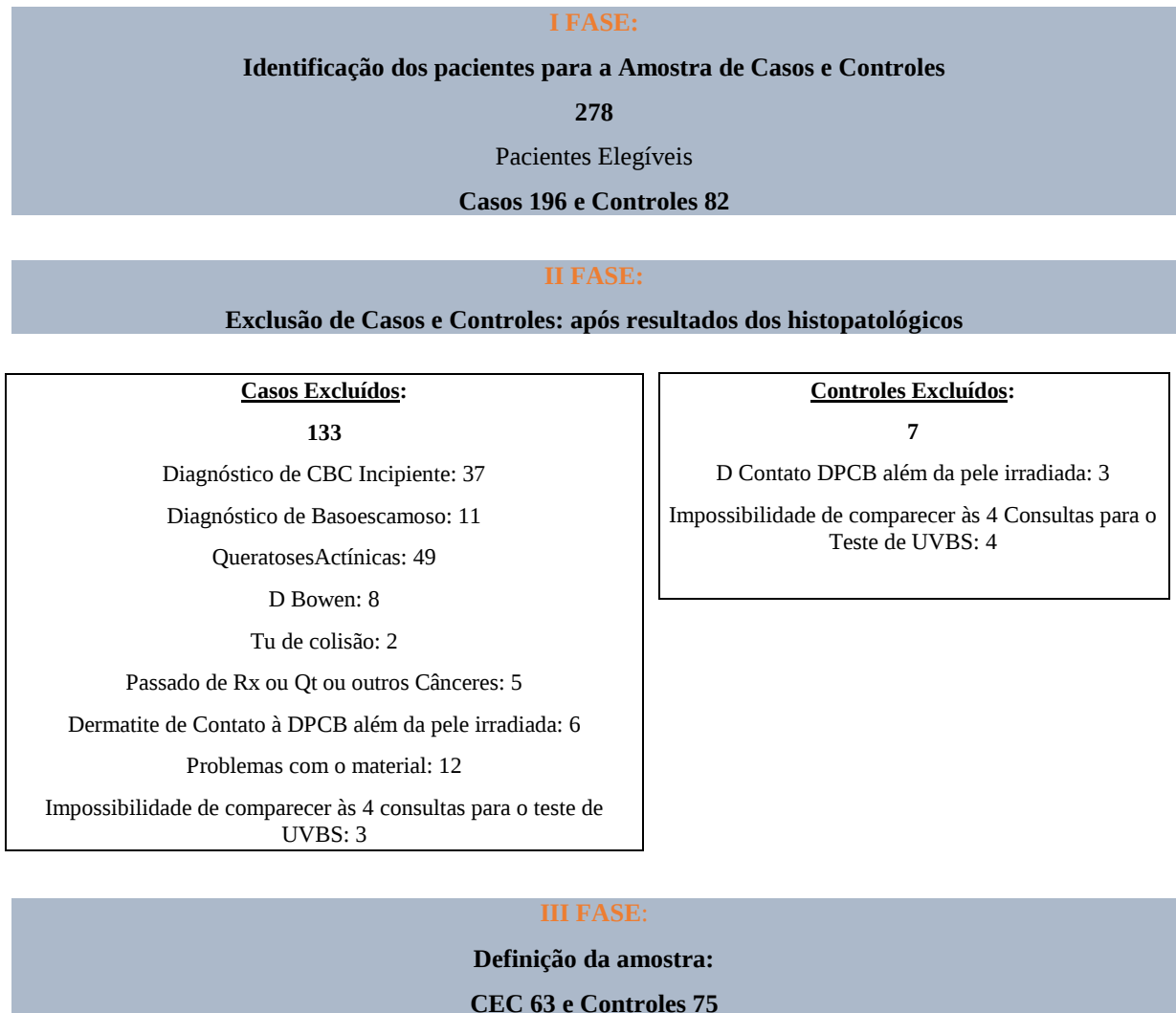
4.9 Determinação da expressão TLR9

A identificação da Expressão Toll-Like Receptor 9 (TLR9) foi realizada por citometria de fluxo utilizando os reagentes BD™ Phosflow (BD Biosciences, USA). As células obtidas

foram fixadas com 100 μ L de BD Cytofix/Cytoperm™ pré-aquecido e incubadas por 10 minutos à 37 °C. Em seguida, após centrifugação à 250 xg por 8 minutos, o sobrenadante foi descartado e realizada a marcação de superfície celular com os anticorpos monoclonais anti-CD3, CD20 e CD14. Após incubação de 20 minutos à temperatura ambiente e protegido da luz, as células foram permeabilizadas com 750 μ l de Perm Buffer III à 4 °C e incubadas por 30 minutos no gelo, protegidas da luz. Em seguida, as células foram lavadas com 3 mL de PBS, centrifugadas à 250 xg por 8 minutos e o sobrenadante foi descartado. Duas etapas de lavagem foram realizadas. Posteriormente foi realizada a marcação intracelular com os anticorpos monoclonais anti- TLR9 e realizada incubação por 40 minutos protegido da luz. Por fim, uma nova etapa de lavagem foi realizada, o sobrenadante descartado e as células foram ressuspensas em 300 μ L de Stain Buffer e realizada aquisição no citômetro de fluxo. Após a etapa de permeabilização, foi adicionado mAB anti-TLR9, (BD, Pharmigen, San Diego, CA) e incubado à 4°C por 30 min e protegido da luz. Após a incubação, adicionando-se 2 mL de Perm/Wash 1x concentrado (BD, Cytofix/Cytoperm™ Becton Dickinson, Sunnyvale, CA) e centrifugado a 300 x g por 5 min a 20 °C (FACSVERSE, Becton Dickinson, Sunnyvale, CA).

Foram adquiridos 50.000 eventos celulares e as análises dos resultados foram realizadas com o programa *FACSSUITE* (Becton Dickinson, Sunnyvale, CA) e expressas em valores percentuais.

Figura 1 - Fluxograma da Seleção dos Casos e Controles



Fonte: A autora

4.10 Análise dos dados

Os dados do questionário foram digitados em dupla entrada e comparados no programa *validatedo software epi-info* versão 6,0. A análise univariada foi realizada no *epi-info* a multivariada no programa *stata* versão 9,0.

Os resultados do estudo foram analisados em duas etapas:

1) ETAPA- foi verificada a associação entre o HPV Beta e o CEC.

a) Variável independente:

- Presença do HPV Beta DNA
- Ausência do HPV Beta DNA

b) Variável dependente:

- CEC
- Não CEC

Para verificar a associação entre o HPV-Beta e o CEC foram calculados o *oddsratio* bruto e ajustado, intervalo de confiança de 95% e valor de p para a associação HPV-Beta e o CEC. Foi testado um modelo de análise de regressão logística múltipla utilizando-se o HPV-Beta e as demais variáveis de confusão como possíveis preditoras do CEC.

Os potenciais fatores de confusão foram distribuídos em blocos, procedendo-se à análise uni e multivariada por regressão logística, dentro de cada bloco.

Foram selecionadas para análise multivariada de cada bloco as variáveis que, na análise univariada, apresentaram valor de $p < 0,20$, permanecendo no modelo final aquelas variáveis que, após análise multivariada, apresentarem um valor de $p < 0,05$.

Em seguida foi rodado um modelo multivariado final com as variáveis selecionadas nos modelos multivariados de cada bloco. A estratégia utilizada foi *step-up*, sendo as variáveis introduzidas sequencialmente no modelo, de acordo com o valor de p .

A associação HPV-Beta e o CEC foi ajustada pelo conjunto das variáveis selecionadas em cada bloco e pelo multivariado final.

2) ETAPA- foi verificada a associação entre o fenótipo de UVB-S e CEC.**a) Variável Independente:**

- UVBS
- UVBR

b) Variável dependente:

- CEC
- Não CEC

Para verificar a associação entre o fenótipo de UVB-S e o CEC foram calculados o *oddsratio* bruto e ajustado, intervalo de confiança de 95% e valor de p para a associação UVB-S e o CEC. Foi testado um modelo de análise de regressão logística múltipla utilizando-se a UVB-S e as demais variáveis de confusão como possíveis preditoras do CEC.

Os potenciais fatores de confusão foram distribuídos em blocos, procedendo-se à análise uni e multivariada por regressão logística, dentro de cada bloco.

Foram selecionadas para análise multivariada de cada bloco as variáveis que, na análise univariada, apresentarem valor de $p < 0,20$, permanecendo no modelo final aquelas variáveis que, após análise multivariada, apresentarem um valor de $p < 0,05$.

Em seguida foi rodado um modelo multivariado final com as variáveis selecionadas nos modelos multivariados de cada bloco. A estratégia utilizada foi *step-up*, sendo as variáveis introduzidas sequencialmente no modelo, de acordo com o valor de p .

A associação UVB-S e o CEC foi ajustada pelo conjunto das variáveis selecionadas em cada bloco e pelo multivariado final.

3) ETAPA- em subamostra, foi verificada a Expressão TLR9 em Casos e Controles, em UVBS e UVBR

Foi calculado o valor de p para a associação das variáveis Sócio-Demográficas, Antecedente de Ca de Pele, Exposições químicas, Fototipo de pele da Classificação de Fitzpatrick, UVB-S, e o CEC em Pele Fotoexposta em Adultos e idosos. Foram aplicados os testes quiquadrado e Fisher. Para as variáveis Idade e IMC foi aplicado o teste t de Student. Foram consideradas associadas as variáveis com valor de $p < 0,05$.

Na análise da Média de Intensidade de Fluorescência (MFI) de TLR9 foi inicialmente aplicado o teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Foi observada a distribuição da Expressão TLR9 pela MFI entre os grupos celulares, tendo sido expressa em mediana e interquartil (IQR: 25%-75%). Foi realizado o teste de *Mann-Whitney* para comparar valores de mediana entre grupos celulares. Foi adotado o nível de significância estatística de $p < 0,05$. A análise estatística foi realizada através do *graphpadprism v6.0* (Graphpad software, San Diego, CA).

4.11 Limitações metodológicas do estudo

Podemos considerar nos estudos analíticos dois tipos principais de erros: o erro randômico que depende do tamanho da amostra e o erro sistemático (viés ou bias), que está relacionado à forma pela qual as informações são obtidas, registradas ou interpretadas ou à forma de seleção dos indivíduos.

Realizamos o cálculo da amostra tendo por base as principais exposições UVBS e o HPV Beta.

No que diz respeito ao erro sistemático algumas considerações podem ser feitas: nos estudos caso controle podem ocorrer, principalmente, viés de seleção, informação e confundimento.

4.11.1 Viés de seleção

- a) No caso de recusa em participar do estudo, foi solicitado o máximo de dados destes indivíduos a fim de compará-los com os demais indivíduos integrantes do projeto;
- b) Houve seleção de casos e controles com proximidade máxima da semelhança principalmente quanto às variáveis cor de pele e idade. O viés de seleção foi minimizado pela seleção dos casos no ambulatório de câncer de pele do HCP e controles dos ambulatórios de dermatologia geral do HOF. É possível que haja limitação na extrapolação dos resultados porque este estudo realizou-se em uma população de base hospitalar em serviço de referência no estado de Pernambuco;
- c) A possibilidade do viés de seleção em decorrência de patologias outras já decorrentes do estado de maior suscetibilidade às radiações ultravioleta. Procuramos minimizar este viés pela não inclusão de portadores de Herpes simples recidivante, de hanseníase, tendo em vista a UVB-suscetibilidade já funcionar como marcador de risco para estas patologias cutâneas (VERMEER et al., 1991);
- d) A possibilidade de viés de seleção por perdas em decorrência do grande incômodo provocado pela aplicação do DPCB, com posterior rejeição de persistir no trabalho pelo paciente; possibilidade de mudança de endereço. Procuramos minimizar estes pelo esclarecimento exaustivo aos participantes do incômodo, que, no entanto, é completamente suportável provocado pela aplicação do difenciprone, informando acerca do pequeno grau de irritação primária na primeira aplicação. Solicitaremos ao voluntário informar, caso ocorra, mudança de endereço esclarecendo sobre a importância do mesmo persistir até o fim do protocolo;
- e) É possível a ocorrência de não entendimentos ou receio de se submeter aos testes para verificação da UVB-S e pesquisa de HPV DNA, por parte do (a) doente selecionado, com conseqüente desistência de participação ou abandono, podendo constituir-se em vieses de seleção. Procuraremos minimizar estes através do esclarecimento da finalidade da pesquisa de forma clara, objetiva, em linguagem coloquial, a todos os voluntários, esperando, dessa forma uma maior adesão e persistência até o final da pesquisa.

4.11.2 Viés de informação

- a) As informações sobre a exposição podem não ser colhidas da mesma forma entre casos e controles. Com o objetivo de reduzir o viés de informação, foram adotadas as seguintes medidas:
- Utilização de um instrumento para coleta e registro de dados operacionalizado por um mesmo indivíduo;
 - Padronização da forma de investigação, das técnicas e medidas registradas: foram utilizadas técnicas padronizadas para as determinações da dose eritematosa mínima, do fenótipo de suscetibilidade (UVB-S) ou resistência (UVB-R) à RUVB. A presença do HPV Beta foi verificada através da técnica da Reação em cadeia da polimerase (PCR), com dois primers distintos, específicos para o HPV BETA, o PM-PCR, e o FAP-PCR. Foram realizadas biópsia, Dermatoscopia e histopatológico para diagnóstico do CEC em todos os casos. O viés de memória em relação às informações referentes à exposição ao difenciprone foram minimizados, pela averiguação dos dados pregressos registrados em prontuários, além disso, ambos os grupos de comparação foram estimulados da mesma forma quanto às perguntas do instrumento de coleta de dados; os erros de classificação em relação ao diagnóstico da doença foram minimizados pelo diagnóstico clínico, Dermatoscopia e biópsia em todos os indivíduos com lesão suspeita de CEC. Foi realizado o teste de Reação em cadeia da Polimerase para a caracterização dos subtipos de HPV com a utilização de 2 primers específicos para o HPV Beta.

4.11.3 Confundimento

Para controlar os possíveis fatores de confusão foram utilizadas as seguintes estratégias:

- a) Análise estratificada: foram utilizados recursos como estratificação para identificar outros possíveis fatores de confusão (idade, sexo);
- b) Modelos estatísticos análises uni e multivariadas por regressão logística.

4.12 Riscos ao paciente

Os riscos potenciais foram inerentes aos procedimentos de rotina e que são realizados independentemente da pesquisa. São eles, a punção de veia periférica para a dosagem do TLR-9 e a realização da biópsia por exérese da lesão para a confirmação do diagnóstico. A biópsia faz parte da rotina e a punção de veia periférica já está preconizada na realização dos exames de sangue pré-operatórios e apenas acrescentamos o exame para identificação da Expressão TLR9.

Nestes procedimentos as complicações possíveis consistem de formação de hematoma por sangramento e infecção e deiscência de ferida operatória.

5 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O Projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da UFPE e do Hospital de Câncer de Pernambuco (HCP), só tendo sido iniciado após a liberação pelos referidos CEPs.

Todos os pacientes assinaram o TCLE e só após assinatura demos início ao preenchimento do questionário e exames para coleta dos dados.

Todos os pacientes foram examinados, diagnosticados e tratados igualmente e independentemente de aceitarem ou não participar da pesquisa. Para aqueles que aceitaram participar foram informados sobre todos os procedimentos a serem realizados e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

O projeto foi submetido ao Edital Universal do CNPq tendo sido selecionado para receber financiamento. (Chamada: MCTI/CNPq/Universal 14/2014 – Faixa C – até 120.000,00. Número do Processo: 445399/2014-7).

6 RESULTADOS

6.1 Artigo 1 - A UVB-Suscetibilidade e o HPV Beta como fatores de risco para o Carcinoma Espinocelular na Pele Fotoexposta em adultos e idosos

Authors:

Mecciene Mendes Rodrigues^{1, 2, 3, 6}

Julia Smith Cavalcante⁴

Joana D'arc Rozendo dos Santos⁴

Sandra Elizabeth Barbosa da Silva⁴

Danyelly Bruneska Gondim Martins⁴

Ricardo Arraes de Alencar Ximenes^{1,5}

¹Postgraduate Program in Tropical Medicine, Center for Health Sciences (CCS), Federal University of Pernambuco (UFPE), Recife, Pernambuco, Brazil

²Cancer Hospital of Pernambuco - Sociedade Pernambucana de Combate ao Câncer, (HCP), Recife, Brazil.

³Professor of Dermatology at the Agreste Academic Center - Nucleus of Life Sciences - Universidade Federal de Pernambuco – Caruaru - Brazil

⁴Keizo Asami Immunopathology Laboratory - Universidade Federal de Pernambuco - Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) – Recife - Brazil.

⁵State University of Pernambuco, Recife, Brazil – Universidade de Pernambuco, Recife, Pernambuco – Brazil

⁶Professor of the postgraduate course in integral health – Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira – IMIP.

Corresponding author:

Mecciene Mendes Rodrigues

Agreste Academic Center - Nucleus of Life Sciences - Universidade Federal de Pernambuco – Caruaru - Brazil

Rodovia BR-104, Km 59, s/n - Nova Caruaru, Caruaru - PE, 55002-970

Telefone: + 55 81 99167-9416

E-mail: mecciene@gmail.com

Background: O Carcinoma Espinocelular apresenta-se com índices de prevalência crescentes globalmente e a exposição à Radiação Ultravioleta B persiste como principal fator de risco de carcinoma espinocelular, observando-se o traço genético de UVBSuscetibilidade em 92% dos casos.¹² Há associação do HPVBeta ao carcinoma espinocelular em pele fotoexposta de imunossuprimidos e de pacientes com Epidermodisplasia Verruciforme, mas, em imunocompetentes são necessários esclarecimentos sobre se há associação e os fatores associados à infecção e persistência do HPVBeta no CEC em pele fotoexposta.

Objective: Nós verificamos a UVBSuscetibilidade e o HPVBeta no carcinoma espinocelular em pele fotoexposta de pacientes adultos e idosos atendidos em ambulatório de referência em câncer de pele em Recife - Brazil.

Methods: O estudo foi do tipo Caso-Controle. Foram calculados o *Odds Ratio* bruto e ajustado, intervalo de confiança de 95% e valor de p para a associação das variáveis Sócio-Demográficas, Antecedente de câncer de Pele, Exposições químicas e Fotoexposição, UVBSuscetibilidade e o HPV Beta no carcinoma espinocelular em Pele Fotoexposta de Adultos e idosos. Foram aplicados os testes quiquadrado e Fisher. Para as variáveis Idade e Índice de Massa Corpórea foi aplicado o teste t de Student. Procedeu-se à análise univariada e foram selecionadas para análise multivariada as variáveis que apresentaram valor de $p < 0,20$, permanecendo no modelo final aquelas variáveis que apresentaram um valor de $p < 0,05$. As associações UVB-Suscetibilidade e o HPVBeta ao carcinoma espinocelular foram ajustadas pelo conjunto das variáveis selecionadas e pelo modelo multivariado final.

Results: Foram diagnosticados 63 casos de pacientes com carcinoma espinocelular em pele fotoexposta de adultos e idosos (64,6% Estádios I e II). Após análise multivariada, persistiram no modelo final: a UVBS ($p < 0,015$), positividade para, ao menos um subtipo de HPVBeta em pele fotoexposta ($p < 0,01$), as Fotorreatividades I e II da classificação de Fitzpatrick ($p < 0,001$), as queimaduras por RUVB antes dos 20 anos ($p < 0,001$) e o sexo masculino ($p < 0,001$).

Limitations: Tamanho da amostra estudada; Não foi verificado o subtipo de HPVBeta; Não foi verificada atividade viral nas lesões;

Conclusion: A UVBSuscetibilidade e a positividade para, ao menos, um subtipo do HPVBeta na pele fotoexposta são fatores de risco para o carcinoma espinocelular.

Key words: UVB Radiation; UVBSusceptibility; Sunburn; HPVBeta; SCC; AK; NMSC; Odds Ratio; Fitzpatrick skin phototypes.

INTRODUÇÃO

A exposição à Radiação Ultravioleta B (RUVB) persiste como o principal fator de risco dos Cânceres de Pele Não Melanoma em caucasianos (CPNM); ¹⁻³ e o Carcinoma Espinocelular (CEC) é o segundo em prevalência no grupo, correspondendo a cerca de 20% dos CPNM no Brasil.⁴ O CEC apresenta incidência crescente em todo o mundo,⁵ a depender da exposição à RUVB, ^{6,7} da localização geográfica,⁸ ou de algumas categorias profissionais,⁹ observando-se, entretanto, que a condição de ser UVBS, é um melhor indicador de risco de CEC.¹⁰

Observa-se o traço fenotípico de UVBS em mais de 90% dos portadores de CEC, contra apenas, 40% da população.^{11,12} Em UVBS há deficiência na resposta imunológica inata e adaptativa em situação de exposição a doses mínimas de radiação Ultravioleta B (RUVB), de duas vezes a Dose Eritematosa Mínima (DEM), devido à variabilidade genética. Há, nas exposições agudas, supressão da imunidade mediada por células (IMC) e da hipersensibilidade de contato (HC) com déficit no reconhecimento de novos antígenos e de memória imunológica e predisposição a algumas infecções por patógenos intracelulares tais como o herpes simples recidivante ^{12,13,14,15} e a hanseníase virchowiana.¹⁶ Na carcinogênese, em indivíduos UVBS, as células que sofreram dano em seu DNA pela Radiação Ultravioleta B (RUVB), expressam mutação no gene supressor do tumor, o p53, com prejuízo da apoptose e consequente indução do CEC. ^{6,17,18}

O maior fator de risco para o CEC cutâneo é a exposição à RUVB, havendo associação do HPV Beta (HPVBeta) ao CEC em pele exposta à RUVB, em imunossuprimidos e em portadores da EV. Em pacientes não imunossuprimidos, não EV, são necessários esclarecimentos sobre se há associação do HPVBeta ao CEC e, também, se há associação do HPVBeta à pele fotoexposta. Há relatos da associação do HPVBeta ao CEC em pele fotoexposta e do HPVBeta à pele fotoexposta¹⁹ e há estudos que não evidenciaram diferença na prevalência do HPV cutâneo em pele fotoexposta, a exemplo de Harwood et al.²⁰ Mais recentemente, um estudo determinou a prevalência do HPV cutâneo em vários tipos de lesões de pele benígnas, queratose actínica (AK), CEC e CBC, e observou que, os HPVBeta foram os mais frequentes em todas as lesões, e, foram observados em todos os casos de AK e de CEC, que foram positivos para o HPV; não observou-se associação tipo-específica.²¹

Nos indivíduos não imunossuprimidos, não EV, possivelmente, são necessários fatores adicionais para tornar o indivíduo predisposto à infecção e à persistência do HPVBeta na pele

fotoexposta, que precisam ser esclarecidos. Neste estudos nos propomos a verificar o risco da condição da UVBS e da presença do HPV Beta associados ao CPNM, apenas, do tipo CEC em pele fotoexposta de adultos e idosos, e que, não foram relatados na literatura até o momento.

METHODS

Pacientes

Os pacientes foram selecionados por ocasião da consulta no ambulatório de Dermatologia do Hospital de Câncer de Pernambuco (HCP), divididos em dois grupos:

- a) Pacientes Casos: foram os pacientes portadores de CPNM, do tipo CEC;
- b) Pacientes Controles: foram os pacientes sem câncer de pele, definido pelos critérios de exclusão.

Crítérios de inclusão para casos e controles

Idade: ≥ 18 anos.

Crítérios de exclusão para casos e controles

- a) Presença de outras lesões papilomatosas ou verrucosas ou escamo-queratóticas, identificadas através do exame clínico de pele e mucosas;
- b) Portadores de doenças com comprovada relação com UVB-S como o herpes simples recidivante, hanseníase ou pitiríase versicolor; foi verificada durante a anamnese e busca de registro em prontuário médico;
- c) Portadores de doenças imunossupressoras, infecções de pele ou outras de repetição, em corticoterapia ou em uso de outros imunossupressores, foi verificada através da anamnese, exame físico, busca de registro em prontuário médico e realização de exames laboratoriais;
- d) Gestantes: foi verificada através da anamnese e exame laboratorial Beta-HCG;
- e) Pessoas com história de exposição prévia à substância difenciprone, um hipersensibilizante de contato que foi utilizado para a identificação dos indivíduos UVB-S.

Após a seleção os pacientes eram comunicados sobre a pesquisa e convidados a participar. Aqueles que aceitaram participar assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CEP-CCS-UFPE) e aprovado

sob o CAAE 21971913.7.0000.5208 e do Hospital de Câncer de Pernambuco (HCP) sob o CAAE 61716916.6.0000.5205.

CARACTERÍSTICAS SÓCIODEMOGRÁFICAS		
	Definição	Categorização
Idade	Anos completos de vida no dia da entrevista, de acordo com a data de nascimento.	< 60 anos ≥ 60 anos
Sexo	Referente ao gênero masculino ou feminino.	Masculino. Feminino
VARIÁVEIS REFERENTES À FOTOEXPOSIÇÃO		
Fototipos da classificação de Fitzpatrick		
Muito sensível	Queima com facilidade, nunca bronzeia	I – Branca-Ruiva
Sensível	Queima com facilidade, bronzeia muito pouco	II - Branca
Normal	Queima moderadamente, bronzeia moderadamente	III - Morena Clara
Normal	Queima pouco, bronzeia com facilidade	IV - Morena Moderada
Pouco sensível	Queima raramente, bronzeia bastante	V - Morena Escura
Insensível	Nunca queima, totalmente pigmentada	VI - Negra
Nível de exposição ao sol por sítio anatômico (profissional)		
Exposição intensa	Cabeça, pescoço e dorso das mãos.	Categoria I
Exposição moderada	Tronco e extremidades	Categoria II
Suscetibilidade à Radiação Ultravioleta B	São aqueles indivíduos que quando expostos a pequenas doses de RUVB de duas vezes a dose eritematosa mínima (DEM), antes da aplicação do hapteno difenciprone, não desenvolvem a dermatite de contato que seria esperada após a segunda exposição e	UVB-S

Resistência à Radiação Ultravioleta B	que ocorre naqueles UVB-resistentes (UVB-R). São aqueles indivíduos que quando expostos a pequenas doses de RUVB de duas vezes a dose eritematosa mínima (DEM), antes da aplicação do hapteno difenciprone, desenvolvem a dermatite de contato esperada após a segunda exposição e que não ocorre naqueles UVB-suscetíveis (UVB-S).	UVB-R
Classificação da exposição	Definição	Categorização
HPV Beta		
HPV BETA	identificada a presença de, ao menos, um subtipo do DNA HPVbeta através da reação em cadeia da polimerase (PCR)	Sim Não

Quadro 1- Caracterização Sociodemográficas e referentes à Fotoexposição dos pacientes da amostra.

Irradiação com UVB

O protocolo para a exposição à RUVB e determinação da dose eritematosa mínima (DEM) seguiu o protocolo descrito por Rae et al.²² Com algumas modificações: a fonte manual de RUVB -UVB Narrow Band- que emite uma radiação ultravioleta com espectro contínuo e pico entre 311 e 312 nm, colocado a 2,5 cm de distância. O tempo de exposição foi expresso como energia por unidade de superfície (mJ/m^2). A área escolhida da superfície corpórea foi a porção não bronzeada do terço inferior do dorso do tronco.

A área de teste foi revestida por uma película foto-opaca, com seis aberturas de 2cm^2 , que foram irradiadas com $3 \text{ mJ}/\text{m}^2$; $4,5 \text{ mJ}/\text{m}^2$; $6 \text{ mJ}/\text{m}^2$; $9 \text{ mJ}/\text{m}^2$; $12 \text{ mJ}/\text{m}^2$; $18 \text{ mJ}/\text{m}^2$; $24\text{mJ}/\text{m}^2$; $36\text{mJ}/\text{m}^2$. Os quadrados eram fechados de forma progressiva nos tempos correspondentes. Os pacientes foram orientados a evitar a exposição solar durante o período de observação.

A DEM foi definida como o tempo necessário para que houvesse formação de um eritema discreto, com bordas bem definidas e sem formação de bolhas, após exposição única à RUVB, sendo expressa como energia por unidade de superfície (mJ/cm^2). Após 16 a 24 horas da exposição foi realizada a leitura do eritema e identificada a DEM.

Teste de contato em área de dorso previamente irradiada

Em área correspondente a duas vezes a DEM era aplicado 0,1ml de difenciprone (DPCB) a 0,05% diluído em acetona e fixado na pele irradiada por um adesivo hipoalergênico, que era removido após 24 horas quando observava-se o efeito irritante primário do sensibilizante.

Teste de Suscetibilidade à Radiação Ultravioleta B (UVBS)

Após 21 a 28 dias da sensibilização com DPCB a 0,05%, foi realizado um teste de contato para verificação da hipersensibilidade de contato ao DPCB diluído a 0,001%, colocado em área não irradiada do dorso em nível da omoplata. A leitura foi realizada após 48 horas da aplicação, sempre pela mesma observadora, que aguardou, pelo menos, 30 minutos após a retirada do adesivo, e a leitura obedeceu aos seguintes critérios:

Tabela 1 – Resposta ao teste de contato com DPCB na caracterização dos indivíduos em UVBS e UVBR

(-)	Reação negativa;
(+)	Reação fraca = eritema discreto, pouca infiltração, sem vesiculação;
(++)	Reação forte = eritema moderado, pápulas ocasionais, poucas vesículas;
(+++)	Reação muito forte = forte edema e muitas vesículas;
(++++)	Reação extrema = formação de bolhas e ulceração.

Legenda: -Negativa = não reatores: considerados UVBsuscetíveis (UVB-S);

-Positiva = reatores: UVB-resistentes (UVB-R).

Dermatoscopia

Foram aplicados os critérios dermatoscópicos descritos por Zalaudek et al., 2012²³.

Biópsia cutânea e histopatológico

Foi realizada com Punch descartável 6mm, precedida por anti-sepsia da área e anestesia local.

Os fragmentos para exame histológico foram fixados em formol a 10%, tamponados para a histologia, e realizou-se a coloração por Hematoxilina-Eosina (HE).

Foram considerados CEC os seguintes achados histopatológicos:

- a) **CEC “in situ”:** queratinócitos atípicos ocupando parte ou toda a epiderme, caracterizados por pleomorfismo nuclear. Presença de hiperqueratose e paraqueratose;
- b) **CEC invasivo:** proliferação de lóbulos e ilhas destacadas de queratinócitos eosinófilos brilhantes contendo núcleo com algum grau de pleomorfismo e mitoses. Nucléolo proeminente e presença de pérolas córneas e células apoptóticas. Presença de invasão representada por ilhas tumorais desconectadas em vários níveis da derme.

Material para PCR e identificação do HPV Beta

Procediam-se à escarificação da lesão suspeita de CEC, da região do corpo espelho da lesão de CEC e de área fotoexposta de punho e dorso de mão, sendo este último, para Casos e Controles. O material era armazenado a menos -80°.

Extração automatizada de DNA

As amostras de escarificação de pele coletadas foram mantidas em tampão PBS, estocadas a -20oC até serem utilizadas para extração de DNA. O QIASymphony DNA Mini Kit foi utilizado para extração automatizada de DNA através do QIASymphony SP automated system (Qiagen), seguindo as instruções do fabricante. Todas as amostras foram submetidas a uma etapa de digestão com Proteinase K antes de inseridas no sistema para a extração. A concentração do DNA diluído foi avaliada em NanoDrop 2000 (Thermo Scientific™) e posteriormente armazenado a -20oC.

Identificação do HPV

A PM-PCR foi realizado utilizando primers específicos para HPV do grupo beta-papillomavirus, sendo capaz de identificar HPV5, 8, 9, 12, 14, 15, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 36, 37, 38, 47, 49, 75, 76, 80, 93, 96, 104, 110, 111 e 145.²⁴ A análise por PCR foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Koning et al.,²⁴ com pequenas modificações.

A PM-PCR foi preparada para o volume final de 12.5ul contendo 6.25ul GoTaq Green Master Mix (Promega), 1ul do DNA eluído (até 100ng), 10pmoles PM-A (5'-ACTGACCAAAGCTGGAAATC-3') e 10 pmoles PM-D primer (5'-TCTTGCAGAGCATTGAAACG-3'). A reação de PCR foi realizada no MyCycler™ thermal cycler (BioRad), sob a seguinte ciclagem: 95°C por 1 min, seguido de 35 ciclos de 95°C por 30s, 52°C por 45s, e 72°C a 45s; seguido de extensão final a 72°C por 5 min. O fragmento gerado de 117 pb referente à amplificação de uma região do gene E1 do HPV foi observada em agarose 1% preparada em tampão TB e visualizada pela presença do brometo de etídio (10 µg/ml).

A FAP-PCR foi realizado utilizando primers específicos para HPV do grupo beta-papillomavirus, sendo capaz de identificar HPV3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 20, 21, 22, 23, 24, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 36, 37, 38, 39, 42, 43, 45, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 57, 59, 60, 61, 62, 64, 65, 67, 68, 69, 70, 72, 73, 75, 76, 77 e 80.²⁰ A análise por PCR foi realizada de acordo com Koning et al.,²⁵ com pequenas modificações. A FAP-PCR foi preparada para o volume final de 12.5ul contendo 6.25ul GoTaq Green Master Mix (Promega), 1ul do DNA eluído (até 100ng), 10pmoles FAP59 (5'-TAACWGTIGGICAYCCWTATT-3') e 10pmoles FAP64 (5'-CCWATATCWVHCATITCICCATC-3'). A PCR foi realizada utilizando o Veriti™ Thermal Cycler (Applied Biosystems™), com os seguintes parâmetros: 5 min a 95°C; 45 ciclos de 1 min a 95°C, 60s a 50°C e 60s a 72°C, seguido de extensão final por 5 min a 72°C. O fragmento gerado de 478pb pb referente à amplificação de uma região do gene E1 do HPV foi observada em agarose 1% preparada em tampão TB e visualizada pela presença do brometo de etídio (10 µg/ml).

Análise dos dados

Foram calculados o *Odds Ratio* bruto e ajustado, intervalo de confiança de 95% e valor de *p* para a associação das variáveis Sócio-Demográficas, Antecedente de Câncer de Pele, Exposições químicas e Fotoexposição, Fototipo de pele da Classificação de Fitzpatrick, UVB-S, HPV Beta e o CEC em área de Pele Fotoexposta em adultos e idosos. Foram aplicados os testes qui-quadrado e Fisher. Para as variáveis Idade e IMC foi aplicado o teste t de Student. Foram consideradas associadas as variáveis com valor de *p* < 0,05. Foi testado um modelo de análise de regressão logística múltipla utilizando-se a UVB-S, o HPV Beta e as demais variáveis de confusão como possíveis preditoras do CEC. Foram selecionadas para análise

multivariada as variáveis que, na análise univariada, apresentaram valor de $p < 0,20$, e permaneceram no modelo final aquelas variáveis que, após análise multivariada, apresentaram um valor de $p < 0,05$. A estratégia utilizada foi *step-up*, sendo as variáveis introduzidas sequencialmente no modelo, de acordo com o valor de p . A associação UVB-S, o HPV Beta e o CEC foi ajustada pelo conjunto das variáveis selecionadas e pelo multivariado final.

RESULTADOS

Por critérios Dermatoscópicos e histopatológicos,²⁵ a amostra de CEC foi classificada no Estádio I, para o CEC “in situ” ou intraepitelial (Tis), 45,2%; no Estádio II microinvasivo (T1N0) 19,4% e CEC não caracterizado 35,5%. Foi observado, portanto, 64,6% de casos de CEC diagnosticados precocemente nos Estádios I e II (TNM-AJCC).

Caracterizando o Perfil dos Casos em 51,7% relataram antecedentes de CPNM; 93,4% apresentavam lesões de Queratose Actínica e em 43,9% havia dez ou mais lesões de queratose actínica (Tabela 1).

Entre os pacientes com CEC a frequência UVBS foi de 69,8%, enquanto nos controles a frequência foi de 24% (OR 7,33 IC 95% 3,45 – 15,6).

A frequência de HPV Beta no grupo CEC foi de 23,4%, enquanto nos Controles foi de 1,8% (OR 17,1 IC 2,12 – 138), quando comparamos lesão do Caso e dorso de mão, porém, considerarmos qualquer sítio de pele em Caso e comparamos com dorso de mão de Controles a frequência foi 36,2% nos Casos e 1,8% nos Controles (OR 31,4 IC 4,02 – 250).

No grupo de exposições à RUVB observou-se quanto ao Fototipo de Pele I e II da Classificação de Fitzpatrick representado em 85,7% dos CEC, enquanto nos Controles em 25,3% (OR 17,7 IC 95% 7,36 – 42,5).

Quanto à Fotoexposição por ocupação em ambiente aberto por 4 ou mais horas e 10 ou mais anos foi observado no CEC em 71% e nos Controles 30,6% (OR 5,07 IC 95% 2,31 – 11,1). Composto ainda o grupo de Exposição à RUVB por ocupação, ter CEC e ser Agricultor foi observado em 41,3% e em 14,75% dos controles (OR 4,09 IC 95% 1,81 – 9,22).

No grupo das exposições químicas as chances de ser tabagista atualmente ou já ter feito uso do tabaco ocorreu no CEC em 57,1% e nos Controles em 38,7% (OR 2,1 IC 95% 1,07 – 4,18). A carga tabágica acima de 35 anos-maço ocorreu em 58,1% dos casos e em 38,7% dos Controles (OR 2,11 IC 1,07 – 4,18).

A $DEM \geq 18 \text{ KJ/cm}^2$ foi observada no CEC em 50% e nos Controles em 72% (OR 0,39 IC 95% 0,18 – 8,84).

Ser do sexo masculino ocorreu no CEC em 58,1% e nos Controles em 26,4% (OR 3,68 e IC 95% 1,87 – 8).

A faixa etária foi nos CEC de $67,3 \pm 13,1$ e nos Controles de $49,1 \pm 14,8$ (OR 1,10 IC 95% 1,06 – 1,12). A faixa etária dos 60 anos foi observada no CEC em 73,1% e nos Controles em 24% (OR 6,33 IC95% 3,01 – 13,3).

A escolaridade ≤ 8 anos estava representada em 68,3% no CEC e em 50,7% dos Controles (OR 2,09 IC 95% 1,04 – 4,20).

Foram selecionadas as variáveis com *p-valor* $<0,20$ para Regressão Logística Múltipla e permaneceram no modelo final as variáveis que apresentaram *p-valor* $<0,05$, caracterizando um perfil de risco de CEC, a UVBS (OR 3,69 IC 1,01 – 13,5); ao menos um subtipo de HPV Beta 9,38 (0,46 – 189,5), a Fotoreatividade I e II da classificação de Fitzpatrick (OR 40,2 IC 9,34 – 172,9); a Queimadura solar após os 20 anos de idade (OR 7,95 IC 1,34 – 47,1); Idade acima dos 60 anos (OR 1,11 IC 1,05 – 1,17) e o Sexo Masculino (OR 9,35 IC 2,26 – 38,8) (Tabelas 2 e 3).

DISCUSSÃO

Os pacientes com CEC da amostra estudada caracterizaram-se por apresentar CEC “in situ” em 45,2% e o microinvasivo em 19,4%. As lesões localizavam-se em face, colo e dorso de mãos em mais de metade dos casos (54,1%), consideradas áreas de pele de maior fotoexposição. Observamos a presença de lesões de Queratose actínica (AK) em 93,4% dos casos, sendo que, em número igual ou maior que 10 AKs em 43,9%. O passado de Câncer de pele não melanoma foi observado em 51,7%.

Foram observadas as seguintes exposições associadas ao CEC na amostra estudada: a UVBS, positividade de, ao menos, um subtipo de HPV Beta, Fotorreatividade I e II da Classificação de Fitzpatrick, queimaduras por RUVB antes dos 20 anos, média de Idade de 60 anos e sexo masculino.

Em nossos resultados, em UVBS, observamos uma razão de chance de CEC de 7,1, em comparação aos Controles estudados. Nesses indivíduos, portanto, a exposição prévia à RUVB, de duas vezes a DEM, impede a hipersensibilidade de contato à DPCB por imunossupressão, caracterizando-se a UVBS. Há décadas foram descritas as diferenças na reatividade ao teste cutâneo em pele previamente exposta a pequenas doses de RUVB entre os indivíduos, e, uma das características é a imunotolerância cutânea e o não reconhecimento de novos antígenos, classificando os indivíduos sem CEC, em UVBS, descrito em 30 - 40%, e, em UVBR, em 60% dos indivíduos sem CEC.²⁶ Em nossos resultados obtivemos a UVBS em

69,8% dos indivíduos com CEC, diferindo da literatura, cuja UVBS é observada em mais de 90% dos casos de CEC em pele fotoexposta.¹² Há algumas possíveis explicações para a proporção de 69,8% de UVBS em pacientes com CEC do nosso estudo, e esta diferença pode ser atribuída ao tamanho da amostra estudada. Outra possível explicação seria a dose de RUVBNB, e, com intuito de observar essa menor proporção de UVBS, do que a esperada no CEC, averiguamos a dose utilizada, e, observamos que a mediana da dose $\geq$ a 18 mJ/cm² foi encontrada em 72% dos Controles, e, em proporção menor, 50% dos pacientes com CEC. Os pacientes Controles, portanto, receberam a dose maior em mais de 70%, e, mesmo assim, foram UVBR em 76%. Concluímos, que, provavelmente, não houve implicação da dose da RUVB utilizada. Aventamos a possibilidade ainda da não utilização do espectro máximo de RUVB ter repercutido na não imunossupressão. Sabendo-se que a curva dose-resposta apresenta um máximo de ação no espectro entre 260 e 270 nm, seguindo-se em 280-290 nm, e declinando de forma constante, e, no declínio máximo a 320 nm, ainda no comprimento de onda da RUVB,²⁸ e, nós utilizamos para a irradiação o espectro entre 311 e 312 nm (UVB-Narrow band). Procuramos, entretanto, minimizar esse efeito por determinar a dose máxima e mínima, que esteve entre 4,5 – 18 Kj/m². Portanto, sendo pouco provável a implicação do espectro de RUVBNB utilizado, ter repercutido na menor proporção da UVBS nos pacientes CEC da amostra estudada. Quanto à dose de RUVB requerida para a carcinogênese, foi relatada por Noonan et al.,²⁸ que, há diferenças na dose requerida, e, que é 13 vezes maior do que aquela requerida para induzir a HC, em 50% dos animais irradiados.

Nossos resultados demonstraram uma positividade para o HPVBeta nos pacientes com CEC com razão de chance de 9,38 em pacientes com HPVBeta positivos, em comparação aos controles. Esses achados diferem dos achados de Asgari et al.²⁹ que não encontrou diferenças em pacientes com CEC em comparação com controles saudáveis. No presente estudo verificou-se também que, ao considerarmos a presença do HPVBeta em todos os sítios em pele fotoexposta a razão de chance de CEC aumenta para 42,8 e, dessa forma, é possível assumir a associação do HPVBeta à pele fotoexposta e ao CEC em pele fotoexposta, ao contrário do achado de Asgari et al.²⁹ de Koning et al.³⁰ e de Harwood et al.,³¹ que não observaram diferenças na prevalência do HPV em pele exposta ou não à RUV. Os nossos resultados estão de acordo com os achados de Forslund et al.¹⁹ que encontraram associação do HPVBeta ao CEC em pele fotoexposta e também às áreas de pele fotoexposta sem lesões. No presente estudo, selecionou-se apenas os pacientes com CPNM do tipo CEC e, no grupo dos Controles, excluiu-se qualquer indivíduo que apresentasse lesões ou dermatoses sugestivas da associação com o HPV, tais como lesões papilomatosas, verrucosas ou escamo-queratóticas, a

exemplo da dermatose papulosa negra, ceratoses e verrugas seborreicas. Dessa forma, reduziu-se a possibilidade do viés de seleção, com a inclusão de indivíduos com Dermatoses possivelmente associadas ao HPVBeta no grupo dos Controles. Nos nosso grupo de Controles, a frequência do HPVBeta observada foi de 1,8%.

Na nossa amostra aplicou-se a PCR para identificação do HPVBeta em CEC “in situ” em 45,2% da amostra estudada, e encontrou-se uma positividade para o HPVBeta em 36,2%. Sugere-se, portanto, a possibilidade da associação do HPVBeta ao CEC na indução, não sendo possível afirmar se na manutenção do CEC, tendo em vista os nossos testes (PCRs) terem sido aplicados em amostra de CEC em fase inicial, “in situ” ou microinvasivo. Na literatura, não há definição se o HPVBeta está associado ao CEC em pele fotoexposta e se a participação se faz na indução ou na manutenção ou em ambas as fases da evolução do CEC. Para alguns autores, a participação do HPVBeta no CEC em pele se dá na indução, mas não na manutenção.^{32,33} Em estudo recente, com análise imunohistoquímica de 3.846 espécimes de biópsias com diagnóstico de CEC “in situ”, observou-se que todos os tumores com a característica multicêntrica apresentaram positividade para o HPV.³⁴

Nossos resultados demonstraram a presença de lesões de Queratose actínica em cerca de 93% dos pacientes com CEC, com um número maior do que 10 em 43,9% dos Casos. Na literatura, relata-se uma associação entre o HPVBeta e a presença de um número maior que 10 lesões de queratose actínica.³⁵ Em outro estudo, foi observada a infecção persistente por HPVBeta associada à presença de lesões de queratose actínica em face.³⁵ Relata-se também a associação do HPVBeta às queratose actínica, apontando-se para uma participação do HPVBeta na indução do CEC.^{32,33}

O presente estudo sugere que a positividade do HPV pode estar associada à pele fotoexposta e ao CEC em pele fotoexposta. A incidência do CEC vem crescendo em todo o mundo,⁵ resultado principalmente de determinantes de exposição ambiental, em especial a exposição à RUVB, que persiste como o principal fator de risco de CEC em caucasianos. A ausência do HPVBeta em pele fotoexposta de Controles aponta para a possibilidade da proteção do fenótipo de UVBR, presente em 76% nos Controles e em apenas 30,2% dos pacientes com CEC. Sugere-se, portanto, que a não predisposição à infecção da pele fotoexposta pelo HPVBeta se explique pela UVBR nesse grupo de indivíduos. Para confirmação dos nossos resultados, faz-se necessária a realização de outros estudos para avaliar a pele exposta com a pele não exposta à RUVB e pesquisar a presença de atividade viral além do HPVDNA.

Os fototipos I e II associaram-se ao CEC em nossos resultados. Os fototipos I e II caracterizam-se por cor de pele e olhos claros, são mais propensos às queimaduras e não bronzeiam ou pouco bronzeiam e associam-se ao CEC, em conformidade com a literatura estudada.³⁷

A profissão de Agricultor, associou-se ao CEC em nosso estudo, na análise univariada. Tendo perdido a associação, no entanto, após ajuste por outras exposições, na análise multivariada, e, não persistiu no modelo final. Noutro estudo foi observado que, categorias profissionais de alto padrão socioeconômico, e, não expostas ao sol, e, algumas profissões potencialmente expostas a substâncias químicas, além de categorias profissionais exercidas em ambientes abertos expostos à RUVB, apresentaram-se com maior risco de CEC comparada à população geral.⁹ Em nosso estudo averiguamos exposição à RUVB no exercício profissional, e, averiguamos algumas exposições químicas, como o Arsênico e outros químicos aplicados na prática Agrícola, e, não encontramos associação.

Observou-se uma associação entre as queimaduras antes dos 20 anos e a ocorrência de CEC, corroborando o achado de S Wu et al.⁸. Ziegler et al.³⁸ relatam que a mutação no gene supressor do tumor p53 encontrada em mais de 90% dos casos de CEC é também observada na queratose actínica, e que a queimadura solar pode selecionar as células de expansão clonal com p53 mutado dentro da queratose actínica, e podem agir duplamente, como iniciadoras e como promotoras do tumor. Foi observado que as queimaduras em tronco estão associadas ao CEC em homens (OR 1,48 IC 1,08 – 2,03).³⁹

Quanto à idade observamos uma associação entre a faixa etária acima dos 60 anos e o CEC. Nossos resultados estão em conformidade com a literatura estudada, que demonstra uma maior incidência de CEC a partir dos 40 anos, com maiores índices, a partir dos 60 anos.^{8,10,40} No entanto, observa-se risco de CEC aumentado em idades mais precoces (15 a 30 anos) na dependência da área geográfica de alta ou média incidência de RUVB.⁴¹

Foi observado em nosso estudo uma maior ocorrência de CEC no sexo masculino. E, como possíveis fatores explicativos, Chen et al.,⁴² observaram diferenças na forma de exposição solar entre os sexos, observando-se que a exposição durante toda a vida está mais relacionada com o risco de CEC em mulheres, enquanto que, a exposição de início precoce parece ser mais relevante para o risco de CEC no sexo masculino. Em nosso estudo não averiguamos essa diferença em comportamento entre os sexos, e, essa seria uma sugestão de exploração para novas pesquisas. Para Rudolph et al.⁵ observa-se aumento da incidência do câncer de pele em ambos os sexos, em todo o mundo, entretanto, a ascensão predomina no sexo feminino, e, essa tendência de crescimento, predominantemente no sexo feminino pode

ser explicado, conforme relatado por Welsh et al.,⁴³ por determinantes genéticos de risco de CPNM diferentes por gênero, na supressão imunológica induzida pela RUVB, tendo-se observado variantes funcionais em IL10 associada a odds ratios aumentados de CPNM, em grande parte, no sexo feminino.

CONCLUSÃO

A presença do HPVBeta em pele fotoexposta é fator de risco para o CEC na população de pacientes assistidos no ambulatório de câncer de pele do Hospital de Câncer de PE - Brazil.

A pesquisa apontou também como fatores de risco de CEC em nossa população: a UVBS, idosos, pele clara, olhos e cabelos claros, e o sexo masculino.

No Brasil, que é um País Tropical, com índices mediano e alto de RUVB, a incidência de CEC vem crescendo e necessitam-se pesquisas que verifiquem fatores associados à infecção e persistência do HPVBeta no CEC em pele fotoexposta tais como deficiência imunológica por suscetibilidade à RUVB em nossa população, e, o HPVBeta, que foi objeto do nosso estudo e sugermos investigação mais aprofundada

Recomendamos que, em serviços e ambulatórios de referência em câncer de pele os pacientes com número maior do que 10 queratoses actínicas sejam observados de forma a procurar lesões suspeitas de CEC à Dermatoscopia e à Histopatologia

Conflict of interest statement

Os autores declararam não haver conflito de interesse

Acknowledgements

Nossos sinceros agradecimentos aos pacientes e familiares que contribuíram com o estudo acreditando em novos conhecimentos científicos no câncer de pele com melhorias na saúde e na qualidade de vida das pessoas.

REFERÊNCIAS

- 1 Armstrong BK, Krickler A. The epidemiology of UV induced skin cancer. *J Photochem Photobiol B*. 2001;63(1-3):8-18.
- 2 Leiter U, Eigentler T, Garbe C. Epidemiology of skin cancer. *Adv Exp Med Biol*. 2014; 810:120-140.
- 3 Rigel DS. Cutaneous Ultraviolet Exposure and Its Relationship to the Development of Skin Cancer. *J Am Acad Dermatol*. 2008; 58(5 Suppl 2):S129-132. doi: 10.1016/j.jaad.2007.04.034
- 4 INCA. Pele não melanoma. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pele_ao_melanoma>. Acesso em: 24 mar. 2016.
- 5 Rudolph C, Schnoor M, Eisemann N, et al. Incidence trends of nonmelanoma skin cancer in Germany from 1998 to 2010. *J Dtsch Dermatol Ges*. 2015; 13(8):788-797. doi: 10.1111/ddg.12690.
- 6 Rebel HG, Bodmann CA., van de Glind GC, et al. UV-induced ablation of the epidermal basal layer including p53-mutant clones resets UV carcinogenesis showing squamous cell carcinomas to originate from interfollicular epidermis. *Carcinogenesis*. 2012; 33(3):714-720. doi: 10.1093/carcin/bgs004.
- 7 Thompson EA, Zhu S, Hall JR, et al. C/EBP α expression is downregulated in human nonmelanoma skin cancers and inactivation of C/EBP α confers susceptibility to UVB-induced skin squamous cell carcinomas. *J Invest Dermatol*.; 131(6):1339-1346. doi: 10.1038/jid.2011.31.
- 8 WU S, Han J, Vleugels RA, et al. Cumulative ultraviolet radiation flux in adulthood and risk of incident skin cancers in women. *Br J Cancer*. 2014; 110:1855–1861. doi:10.1038/bjc.2014.43
- 9 Alfonso JH, Martinsen JI, Pukkala E, et al. Occupation and relative risk cutaneous skin carcinoma (cSCC): A 45-year follow-up study in 4 Nordic countries. *J Am Acad Dermatol* 2016; 75(3):548-555.
- 10 Schmieder GJ, Yoshikawa T, Mata SM, et al. Cumulative sunlight exposure and the risk of developing skin cancer in Florida. *J Dermatol Surg Oncol*. 1992; 18(6):517-522.

- 11 Kurimoto I, Streilein JW. Characterization of the immunogenetic basis of ultraviolet-B light effects on contact hypersensitivity induction. *Immunology*. 1994; 81(3):352-358.
- 12 Yoshikawa T, Era V, Bruins-Slot W., et al. Susceptibility to Effects of UVB Radiation on Induction of Contact Hypersensitivity as a Risk Factor for Skin Cancer in Humans. *The Journal of Investigative Dermatology. J Invest Dermatol*. 1990; 95(5):530-536.
- 13 Taylor JR, Schmieder GJ, Shimizu T, et al. Interrelationship between ultraviolet light and recurrent herpes simplex infections in man. *J Dermatol Sci*. 1994; 8(3):224-232.
- 14 Vermeer M, Streilein JW. Ultraviolet B lighth-induced alterations in epidermal Langerhans cells are mediated in part by tumor necrosis factor-alpha. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 1990; 7(6):258-265.
- 15 Yoshikawa T, Kurimoto I, Streilein JW. Tumour necrosis factor-alpha mediates ultraviolet light B-enhanced expression of contact hypersensitivity. *Immunology*. 1992; 76(2): 264–271.
- 16 Rodrigues MM, Ximenes RAA, Dantas MMS, et al. A UVB-Suscetibilidade como fator de risco para o desenvolvimento da hanseníase virchowiana. *An Bras Dermatol*. 2010; 85(6):835-842.
- 17 Barzilai A, Lyakhovitsky A, Trau H, et al. Expression of p53 in the evolution of squamous cell carcinoma: correlation with the histology of the lesion. *J Am Acad Dermatol*. 2007; 57(4):669-676.
- 18 Marinescu, A, Stepan AE, Margaritescu C, et al. P53, p16 and immunossupression in cutaneous squamous cell carcinoma and its precursos lesions. *Rom J Morphol Embriol*. 2016; 57(2 Suppl):691-696.
- 19 Forslund O., Iftner T., Andersson K. Cutaneous Human Papillomaviruses Found in Sun-Exposed Skin: Beta-papillomavirus Species 2 Predominates in Squamous Cell Carcinoma. *J Infect Dis*. 2007; 196(6): 876–883. doi:10.1086/521031.
- 20 Harwood CA, Suretheran T, Sasieni P, et al. Increased risk of skin cancer associated with the presence of epidermodysplasia verruciformis human papillomavirus types in normal skin. *Br J Dermatol*. 2004; 150(5):949-957.
- 21 Correa RM, Vladimirovsky S, Heideman DA et al. Cutaneous human papillomavirus genotypes in different kinds of skin lesions in Argentina. *J Med Virol*. 2017; 89(2):352-357. doi: 10.1002/jmv.24631.

- 22 Rae V, Yoshikawa T, Bruins – Slot W, et al. An ultraviolet B radiation protocol for complete depletion of human epidermal Langerhans cells. *J Dermatol Surg Oncol.* 1989; 15(11):1199-1202.
- 23 Zalaudek I, Gilacomel J, Schmid K, et al. Dermatoscopy of facial actinic keratosis, intraepidermal carcinoma, and invasive squamous cell carcinoma: A progression model. *J Am Acad Dermatol.* 2012; 66(4):589-597. doi: 10.1016/j.jaad.2011.02.011.
- 24 Koning M, Quint W., Struijk L, et al. Evaluation of a Novel Highly Sensitive, Broad-Spectrum PCR-Reverse Hybridization Assay for Detection and Identification of Beta-Papillomavirus DNA. *J Clin Microbiol.* 2006; 44(5): 1792–1800. doi:10.1128/JCM.44.5.1792–1800.2006.
- 25 Koning M, Forslund O, Bacevskij, et al. Bead-Based Multiplex Genotyping of 58 Cutaneous Human Papillomavirus Types. *J Clin Microbiol.* 2011 Oct; 49(10): 3560–3567. doi: 10.1128/JCM.01173-11.
- 26 Baadsgaard O. In vivo ultraviolet irradiation of human skin results in profound perturbation of the immune system. Relevance to ultraviolet-induced skin cancer. *Arch Dermatol.* 1991; 127(1):99-109.
- 27 De Fabo EC, Noonan FP. Mechanism of immune suppression by ultraviolet irradiation in vivo. I. Evidence for the existence of a unique photoreceptor in skin and its role in photoimmunology. *J Exp Med.* 1983; 158(1):84-98.
- 28 Noonan FP, De Fabo EC, Kripke ML. Suppression of contact hypersensitivity by UV radiation and its relationship to UV-induced suppression of tumor immunity. *Photochem Photobiol.* 1981; 34(6):683-689.
- 29 Asgari MM, Kiviat NB, Critchlow CW, et al. Detection of human papillomavirus DNA in cutaneous squamous cell carcinoma among immunocompetent individuals. *J Invest Dermatol.* 2008; 128(6):1409-1417. doi: 10.1038/sj.jid.5701227.
- 30 De Koning, Weissenborn SJ, Abeni D, et al. Prevalence and associated factors of betapapillomavirus infections in individuals without cutaneous squamous cell carcinoma. *J Gen Virol.* 2009; 90(Pt 7):1611-21. doi: 10.1099/vir.0.010017-0.
- 31 Harwood CA, Suretheran T, Sasieni P, et al. Increased risk of skin cancer associated with the presence of epidermodysplasia verruciformis human papillomavirus types in normal skin. *Br J Dermatol.* 2004;150(5):949-957.

- 32 Aldabagh B, Angeles JGC, Cardones AR, et al. Cutaneous Squamous Cell Carcinoma and Human Papillomavirus: Is There Na Association? *Dermatol Surg.* 2013; 39(1 Pt 1):1-23. Doi: 10.1111/j.1524-4725.2012.02558.x.
- 33 Schiller JT, Buck CB. Cutaneous squamous cell carcinoma: a smoking gun but still no suspects. *J Invest Dermatol.* 2011; 131(8):1595-1596. Doi: 10.1038/jid.2011.151.
- 34 Gross JA, Perniciaro C. Histopathologic Variants of Cutaneous Squamous Cell Carcinoma In Situ With Analysis of Multicentric Subtypes: Possible Relationship to Human Papillomavirus. *Am J Dermatopathol.* 2015; 37(9):680-685. Doi: 10.1097/DAD.0000000000000354.
- 35 McBride P, Neale R, Pandeya N, et al. Sun-related factors, betapapillomavirus, and actinic keratoses: a prospective study. *Arch Dermatol.* 2007; 143(7):862-868.
- 36 Plasmeijer EI1, Neale RE, de Koning MN, et al. Persistence of betapapillomavirus infections as a risk factor for actinic keratoses, precursor to cutaneous squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 2009; 69(23):8926-31. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-1186.
- 37 MacKie RM. Long-term health risk to the skin of ultra-violet radiation. *Prog Biophys Mol Biol.* 2006; *Prog Biophys Mol Biol.* 2006; 92(1):92-96.
- 38 Ziegler A1, Jonason AS, Leffell DJ, et al. Sunburn and p53 in the onset of skin cancer. *Nature.* 1994; 372(6508):773-776.
- 39 Wu S, Cho E, Li WQ, et al. History of Severe Sunburn and Risk of Skin Cancer Among Women and Men in 2 Prospective Cohort Studies. *Am J Epidemiol.* 2016; 183(9):824-833. Doi: 10.1093/aje/kwv282.
- 40 Videnović G, Miljuš D, Ilić D, et al. Nonmelanoma Skin Cancer in the Population of the City of Belgrade in the Period 1999-2011. *Srp Arh Celok Lek.* 2015; 143(5-6):290-295.
- 41 Wei-Passanese EX, Han J, Lin W, et al. Geographical variation in residence and risk of multiple nonmelanoma skin cancers in US women and men. *Photochem Photobiol.* 2012; 88(2):483-489. Doi: 10.1111/j.1751-1097.2012.01077.x.
- 42 Chen Y-C, Christiani DC, Jenny Su HJ. Early-life or lifetime sun exposure, sun reaction, and the risk of squamous cell carcinoma in an Asian population. *Cancer Causes Control.* 2010; 21(5):771-6. Doi: 10.1007/s10552-010-9505-x.

- 43 Welsh MM, Karagas MR, Kuriger JK, et al. Genetic Determinants of UV-Susceptibility in Non-Melanoma Skin Cancer. PLoS One. 2011; 6(7):e20019. Doi: 10.1371/journal.pone.0020019.

Tabela 1 - Características dos pacientes com CEC em pele fotoexposta de adultos e idosos

Características	Número (%)
Passado de câncer de pele	
Sim	31 (51,7%)
Não	29 (48,3%)
Queratose actínica	
Não	4 (6,6%)
Sim	57 (93,4%)
<10	32 (56,1%)
≥ 10	25 (43,9%)
CBC	
Sim	16 (26,2%)
Não	45 (73,8%)
Local do CEC	
Categoria 1	33 (54,1%)
Categoria 2	28 (45,9%)
Estadiamento	
In situ	28 (45,2%)
Microinvasivo	12 (19,4%)
Sem informação no HP	22 (35,5%)

Tabela 2 – Características sociodemográficas, antecedentes de CPNM, UVBS, HPVBeta associados ao CEC em pele fotoexposta de adultos e idosos

(continua)

Variáveis	CEC		OR (IC(95%))	p-valor
	Sim	Não		
	(n = 63)	(n = 75)		
UVB				
Resistente	19 (30,2%)	57 (76,0%)	1,0	
Suscetível	44 (69,8%)	18 (24,0%)	7,33 (3,45 – 15,6)	<0,001
HPVBeta (qualquer sítio)				
Ausência	30 (63,8%)	56 (98,2%)	1,0	
Presença de, ao menos, um subtipo de HPVBeta	17 (36,2%)	1 (1,8%)	31,7 (4,02 – 250,2)	0,001
HPVBeta (apenas na lesão)				
Ausência	36 (76,6%)	56 (98,2%)	1,0	
Presença de, ao menos, um subtipo de HPVBeta	11 (23,4%)	1 (1,8%)	17,1 (2,12 – 138,3)	0,008
Variáveis Sócio-demográficas				
Sexo				
Feminino	26 (41,9%)	53 (73,6%)	1,0	
Masculino	36 (58,1%)	19 (26,4%)	3,86 (1,87 – 8,00)	<0,001
Idade	67,3 ± 13,1	49,1 ± 14,8	1,10 (1,06 – 1,12)	<0,001
Faixa etária				
Menores de 60 anos	21 (26,9%)	57 (76,0%)	1,0	
60 anos ou mais	42 (73,1%)	18 (24,0%)	6,33 (3,01 – 13,3)	<0,001
Escolaridade (em anos)				
> 8 anos	20 (31,7%)	37 (49,3%)	1,0	
≤ 8 anos	43 (68,3%)	38 (50,7%)	2,09 (1,04 – 4,20)	0,038
Renda familiar				
Mais de 3 SM	10 (16,4%)	9 (12,0%)	1,0	
Mais de 1 até 3 SM	36 (59,0%)	42 (56,0%)	0,77 (0,28 – 2,10)	0,613
Até 1SM	15 (24,6%)	24 (32,0%)	0,56 (0,19 – 1,70)	0,309

Tabela 2 – Características sociodemográficas, antecedentes de CPNM, UVBS, HPV Beta associados ao CEC em pele fotoexposta de adultos e idosos

				(continuação)	
Variáveis	CEC		OR (IC(95%))	p-valor	
Antecedentes de câncer de pele					
História de Câncer de pele na família					
Não	48 (76,2%)	62 (82,7%)	1,0	0,348	
Sim	15 (23,8%)	13 (17,3%)	1,49 (0,65 – 3,43)		
Exposição química					
Tabagismo					
Nunca fumou	26 (41,9%)	46 (61,3%)	1,0	0,031	
Fuma atualmente ou fumou	36 (58,1%)	29 (38,7%)	2,11 (1,07 – 4,18)		
Carga tabágica (anos/maço)					
Nunca fumou	26 (44,8%)	46 (61,3%)	1,0	0,158	
Menos de 35	26 (44,8%)	25 (33,3%)	1,84 (0,87 – 3,81)		
35 e mais	6 (10,4%)	4 (5,4%)	2,65 (0,69 – 10,3)		
Exposição ao arsênico					
Não	59 (93,7%)	74 (98,7%)	1,0	0,154	
Sim	4 (6,3%)	1 (1,3%)	5,02 (0,55 – 46,1)		
Profissão ^a					
Não Agricultor	37 (58,7%)	64 (85,3%)	1,0	0,001	
Agricultor (a)	26 (41,3%)	11 (14,7%)	4,09 (1,81 – 9,22)		

Tabela 2 – Características sociodemográficas, antecedentes de CPNM, UVBS, HPVBeta associados ao CEC em pele fotoexposta de adultos e idosos

Variáveis	CEC		OR (IC(95%))	(conclusão)
	Sim (n = 63)	Não (n = 75)		
Fotoexposição				
Fotodano				
Ausência ou Limitado	37 (58,7%)	33 (44,6%)	1,0	0,100
Moderado ou extenso	26 (41,3%)	41 (55,4%)	0,57 (0,29 – 1,11)	
Fototipo de pele da classificação de Fitzpatrick				
III a VI	9 (14,3%)	56 (74,7%)	1,0	<0,001
I e II	54 (85,7%)	19 (25,3%)	17,7 (7,36 – 42,5)	
Já teve queimadura solar				
Não	40 (63,5%)	57 (76,0%)	1,0	0,111
Sim	23 (36,5%)	18 (24,0%)	1,82 (0,87 – 3,81)	
Já teve queimadura solar antes dos 20 anos				
Não teve queimadura solar	41 (65,1%)	61 (81,3%)	1,0	0,210
Depois dos 20 anos	8 (12,7%)	4 (5,3%)	1,77 (0,72 – 4,33)	
Antes dos 20 anos	14 (22,2%)	10 (13,3%)	2,85 (0,83 – 9,79)	
Fotoexposição por ocupação				
Ambiente fechado	15 (24,2%)	38 (52,8%)	1,0	0,522
Ambiente aberto por menos de 10 anos ou menos de 4hs/dia	3 (4,8%)	12 (16,7%)	0,63 (0,16 – 2,57)	
Ambiente aberto por 10 anos ou mais e 4hs ou mais por dia	44 (71,0%)	22 (30,6%)	5,07 (2,31 – 11,1)	
Dose eritematosa mínima				
Média ± dp	18,1 ± 8,9	20,1 ± 8,3	0,97 (0,93 – 1,02)	0,218
Categorizada ^a				
< 18	23 (50,0%)	21 (28,0%)	1,0	0,016
≥ 18	23 (50,0%)	54 (72,0%)	0,39 (0,18 – 0,84)	
Região				
Metropolitana	42 (66,7%)	52 (69,3%)	1,0	0,945
Zona da Mata	7 (11,1%)	9 (12,0%)	0,96 (0,33 – 2,80)	
Agreste	11 (17,5%)	11 (14,7%)	1,23 (0,49 – 3,14)	
Sertão	3 (4,8%)	3 (4,0%)	1,23 (0,23 – 6,45)	
IMC				
Normal	24 (38,1%)	30 (40,0%)	1,0	0,496
Excesso de peso	30 (47,6%)	29 (38,7%)	1,29 (0,62 – 2,71)	
Obesidade	9 (14,3%)	16 (21,3%)	0,70 (0,26 – 1,87)	

Tabela 3 - Modelo multivariado – Regressão logística – Exposições de risco de CEC em pele fotoexposta de adultos e idosos

Variáveis	OR (IC(95%))	p-valor
UVBS		
Resistente	1,0	
Suscetível	7,12 (1,46 – 34,6)	0,015
HPVBeta (qualquer sítio)		
Ausência	1,0	
Presença de, ao menos, um subtipo de HPVBeta	42,8 (2,34 – 780,6)	0,011
Sem informação	2,47 (0,48 – 12,8)	0,280
Sexo		
Feminino	1,0	
Masculino	6,49 (1,27 – 33,2)	0,025
Idade	1,13 (1,06 – 1,20)	<0,001
Fototipo de pele da classificação de Fitzpatrick		
III a VI	1,0	
I e II	99,9 (13,9 – 714,7)	<0,001
Já teve queimadura solar antes dos 20 anos		
Não teve queimadura	1,0	-
Antes dos 20 anos	69,1 (5,76 – 829,2)	0,001
Depois dos 20 anos	2,45 (0,29 – 21,0)	0,414

Tabela 4 - Modelo multivariado – Regressão logística – Exposições de risco de CEC em pele fotoexposta- HPVBeta apenas na lesão - de adultos e idosos

Variáveis	OR (IC(95%))	p-valor
UVB		
Resistente	1,0	
Suscetível	6,11 (1,33 – 28,1)	0,020
HPVBeta (apenas na lesão)		
Ausência	1,0	
Presença de, ao menos, um subtipo de HPVBeta	9,38 (0,46 – 189,5)	0,0144
Sem informação	1,94 (0,40 – 9,46)	0,414
Sexo		
Feminino	1,0	
Masculino	9,29 (1,89 – 45,5)	0,006
Idade	1,13 (1,06 – 1,20)	<0,001
Fototipo de pele da classificação de Fitzpatrick		
III a VI	1,0	
I e II	73,7 (12,3 – 441,1)	<0,001
Já teve queimadura solar antes dos 20 anos		
Não teve queimadura	1,0	-
Antes dos 20 anos	56,5 (5,10 – 625)	0,001
Depois dos 20 anos	2,21 (0,26 – 18,4)	0,464

6.2 Artigo 2 - A UVBSuscetibilidade e a Expressão TollLike Receptor 9 no Carcinoma Espinocelular na pele Fotoexposta em Adultos e Idosos

Authors:

Mecciene Mendes Rodrigues^{1,2, 3,5,6}

Kleber Jatahy³

Leuridan Cavalcante Torres³

Ricardo Arraes de Alencar Ximenes^{1,4}

¹Postgraduate Program in Tropical Medicine, Center for Health Sciences (CCS), Federal University of Pernambuco (UFPE), Recife, Pernambuco, Brazil

²Cancer Hospital of Pernambuco - Sociedade Pernambucana de Combate ao Câncer, (HCP), Recife, Brazil.

³Agreste Academic Center - Nucleus of Life Sciences - Universidade Federal de Pernambuco – Caruaru - Brazil

⁴Translational Research Laboratory Prof. C. A. Hart, Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP) Recife, Brazil.

⁵State University of Pernambuco, Recife, Brazil – Universidade de Pernambuco, Recife, Pernambuco – Brazil

⁶Professor of the postgraduate course in integral health – Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira – IMIP.

Corresponding author:

Mecciene Mendes Rodrigues

Agreste Academic Center - Nucleus of Life Sciences - Universidade Federal de Pernambuco – Caruaru - Brazil

Rodovia BR-104, Km 59, s/n - Nova Caruaru, Caruaru - PE, 55002-970

Telefone: + 55 81 99167-9416

E-mail: mecciene@gmail.com

Abstract

Os Cânceres de Pele Não Melanoma são os tumores mais incidentes em caucasianos, e o Carcinoma Espinocelular corresponde a 20% desses cânceres. A exposição à Radiação Ultravioleta B é o principal fator de risco de Carcinoma Espinocelular na pele fotoexposta, e, 90 % dos indivíduos com Carcinoma Espinocelular são UVB-Suscetíveis. Os Toll Like receptors 9 são receptores de superfície celular e citoplasmáticos, expressos em células do sistema imune e em queratinócitos e são componentes do sistema imune inato, e, nesse estudo avaliamos os Toll Like receptors 9 no Carcinoma Espinocelular em pele fotoexposta de adultos e idosos. Foram avaliados 19 pacientes Carcinoma Espinocelular em pele fotoexposta de adultos e idosos e 16 Controles. Os Casos Carcinoma Espinocelular caracterizaram-se por UVBS em 80% ($p<0,05$); dos Fototipos de pele I e II de Fitzpatrick em 94,7% dos Casos ($p<0,000$); do sexo masculino em 73,4% ($p<0,012$), com média de idade de 70 (± 13) ($p<0,000$). Observou-se que a Média de Intensidade de Fluorescência (MFI) da Expressão TLR9 em linfócitos totais foi diminuída nos pacientes com Carcinoma Espinocelular quando comparado aos controles ($p<0,04$). A MFI da Expressão TLR9 em leucócitos totais, linfócitos totais e células B foi reduzida nos pacientes UVBS quando comparados aos UVBR ($p<0,01$, 0,004 e 0,01, respectivamente). Esses achados sugerem supressão da imunidade inata e adaptativa pela deficiente Expressão TLR9 em indivíduos UVBS e nos pacientes Casos com Carcinoma Espinocelular e que a UVBS pode se constituir em maior risco de CEC também por deficiência na Expressão TLR9. A média de idade de 70 anos observada nos pacientes Carcinoma Espinocelular pode também estar associada à deficiente Expressão TLR9 e atribuímos às alterações ultra estruturais da pele senescente. A Expressão TLR9 em sangue periférico pela Citometria de Fluxo foi de fácil execução e pouco risco. São necessárias novas pesquisas com número maior de participantes.

Key words: UVBS; TLR9; CEC; Citometria de Fluxo; Linfócitos CD14+, CD20+, CD16+; Fototipos de Fitzpatrick.

1 INTRODUÇÃO

A exposição à Radiação Ultravioleta B (RUVB) persiste como o principal fator de risco dos Cânceres de Pele Não Melanoma (CPNM) e o Carcinoma Espinocelular (CEC) é o segundo em prevalência no grupo, correspondendo a cerca de 20% dos CPNM no Brasil. [1, 2]

A UVB-Suscetibilidade (UVBS) constitui marcador de risco de CPNM, é de herança autossômica e está presente em cerca de 90% dos indivíduos com CEC contra 40% da população. [3-5] Em indivíduos UVBS, as células que sofreram dano no DNA pela RUVB expressam mutação no gene supressor do tumor, o p53, com prejuízo da apoptose e consequente indução do CEC. [6]

A exposição à RUVB leva ao dano celular e os fotoprodutos podem se constituir em Padrões moleculares associados ao dano (DAMPs). [7] Os DAMPs são reconhecidos pelos receptores Toll Like (TLRs) que são componentes da imunidade inata. [8] Os TLRs são receptores citoplasmáticos e de superfície celular expressos em Monócitos/Macrófagos, Linfócitos B, células dendríticas e em células epiteliais, existindo 10 TLRs (TLR1 a TLR10) já descritos, destes, tem-se o TLR9 como um dos mais importantes no processo de carcinogênese, sendo capaz de levar ao aumento das citocinas IL-6, IL-12 e TNF α . As citocinas IL1, IL6 e LT β são reconhecidamente promotoras da carcinogênese. [9, 10]

A Expressão TLR9 pode, portanto, promover uma desregulação da resposta imune e levar à carcinogênese por reação inflamatória crônica, angiogênese e imunossupressão. [11-13]

A pele é o maior órgão do corpo humano, é o contato com o meio externo e é um dos componentes sistema imune inato, pois é a principal barreira física do organismo. [14] Por sua localização externa é exposta ao estresse oxidativo, inflamação, imunossupressão, dano ao DNA celular e mutação genética, à fotocarcinogênese e ao fotoenvelhecimento promovidos pela exposição à RUVB. [15, 16]

A expressão TLR9 tem sido estudada nos CECs em localizações não expostas à RUVB no CEC oral, e de cabeça e pescoço, de esôfago, de pulmão e cervical, porém não existem estudos em CEC em pele exposta à RUVB de adultos e idosos. [17-25]

Apesar de passados cerca de cinquenta anos da descoberta das alterações imunológicas e da carcinogênese associadas à exposição à RUVB e à UVBS ainda persistem lacunas sobre quais as moléculas envolvidas e como levam às alterações no sistema imune inato e adaptativo. [26]

Investigamos nesse estudo a UVBS e a expressão TLR 9 no CEC em pele fotoexposta de Adultos e Idosos.

2 MÉTODOS

2.1 Pacientes

Os pacientes foram selecionados por ocasião da consulta no ambulatório de Dermatologia do Hospital de Câncer de Pernambuco (HCP), divididos em dois grupos:

Pacientes Casos: foram os pacientes portadores de CPNM, do tipo CEC.

Pacientes Controles: foram os pacientes sem câncer de pele, definido pelos critérios de exclusão.

2.2 Critérios de inclusão para casos e controles

- Idade de 18 anos ou mais

2.3 Critérios de exclusão para casos e controles

- Presença de outras lesões papilomatosas ou verrucosas identificadas através do exame clínico de pele e mucosas;
- Portadores de doenças com comprovada relação com UVB-S como o herpes simples recidivante, hanseníase ou pitiríase versicolor; foi verificada durante a anamnese e busca de registro em prontuário médico;
- Portadores de doenças imunossupressoras, infecções de pele ou outras de repetição, em corticoterapia ou em uso de outros imunossupressores, foi verificada através da anamnese, exame físico, busca de registro em prontuário médico e realização de exames laboratoriais.
- Gestantes: foi verificada através da anamnese e exame laboratorial Beta-HCG;
- Pessoas com história de exposição prévia à substância difenciprone, um hipersensibilizante de contato que foi utilizado para a identificação dos indivíduos UVB-S.

Após a seleção os pacientes eram comunicados sobre a pesquisa e convidados a participar. Aqueles que aceitaram participar assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CEP-CCS-UFPE) e aprovado sob o CAAE 21971913.7.0000.5208

2.4 Determinação da UVBS

Determinação da dose eritematosa mínima (DEM)

Para a determinação da DEM foi realizada a exposição à fonte manual de RUVB - UVB Narrow Band- que emite uma radiação ultravioleta com espectro contínuo e pico entre 313 e 317 nm (Aparelho do fabricante Pro Lumina), colocado a 2,5 cm de distância. O tempo de exposição foi expresso como energia por unidade de superfície (Kj/m^2). A área escolhida da superfície corpórea foi a porção não bronzeadada do terço inferior do dorso do tronco.

A área de teste foi revestida por uma película foto-opaca, com seis aberturas de 2cm^2 , que foram irradiadas durante 120 segundos (3 Kj/m^2); 180 segundos ($4,5 \text{ Kj/m}^2$); 240 segundos (6 Kj/m^2); 360 segundos (9 Kj/m^2); 480 segundos (12 Kj/m^2); 720 segundos (18 Kj/m^2). Os quadrados eram fechados de forma progressiva nos tempos correspondentes. Os pacientes foram orientados a evitar a exposição solar durante o período de observação.

A DEM foi definida como o tempo necessário para que houvesse formação de um eritema discreto, com bordas bem definidas e sem formação de bolhas, após exposição única à RUVB, sendo expressa como energia por unidade de superfície (KJ/m^2). Após 16 a 24 horas da exposição foi realizada a leitura do eritema e identificada a DEM.

2.5 Teste de contato em área de dorso previamente irradiada

Em área correspondente a duas vezes a DEM era aplicado 0,1ml de difenciprone (DPCB) a 0,05% diluído em acetona e fixado na pele irradiada por um adesivo hipoalergênico, que era removido após 24 horas quando observava-se o efeito irritante primário do sensibilizante.

2.6 Teste de Suscetibilidade à Radiação Ultravioleta B (UVBS)

Após 21 a 28 dias da sensibilização com DPCB a 0,05%, foi realizado um teste de contato para verificação da hipersensibilidade de contato ao DPCB diluído a 0,001%, colocado em área não irradiada do dorso em nível da omoplata. A leitura foi realizada após 48 horas da aplicação, sempre pela mesma observadora, que aguardou, pelo menos, 30 minutos após a retirada do adesivo, e a leitura obedeceu aos seguintes critérios:

Tabela 1: Interpretação da leitura do teste com DPCB a 0,001%

(-)	Reação negativa;
(+)	Reação fraca = eritema discreto, pouca infiltração, sem vesiculação;
(++)	Reação forte = eritema moderado, pápulas ocasionais, poucas vesículas;
(+++)	Reação muito forte = forte edema e muitas vesículas;
(++++)	Reação extrema = formação de bolhas e ulceração.

-Negativa = não reatores: considerados UVBsuscetíveis (UVB-S);

-Positiva = reatores: UVB-resistentes (UVB-R).

2.7 Biópsia cutânea e histopatológico

Foi realizada com Punch descartável 6mm, precedida por anti-sepsia da área e anestesia local.

Os fragmentos para exame histológico foram fixados em formol a 10%, tamponados para a histologia, e realizou-se a coloração por Hematoxilina-Eosina (HE).

Foram considerados CEC os seguintes achados histopatológicos:

CEC “in situ”: presença de queratinócitos atípicos ocupando parte ou toda a epiderme, caracterizados por pleomorfismo nuclear. Presença de hiperqueratose e paraqueratose.

CEC invasivo: presença de proliferação de lóbulos e ilhas destacadas de queratinócitos eosinófilos brilhantes contendo núcleo com algum grau de pleomorfismo e

mitoses. Nucléolo proeminente e presença de pérolas córneas e células apoptóticas. Presença de invasão representada por ilhas tumorais desconectadas em vários níveis da derme.

2.8 Análise da expressão TLR9 por citometria de fluxo

A análise da Expressão TLR9 foi realizada por citometria de fluxo utilizando os reagentes BD™ Phosflow (BD Biosciences, USA). As células foram fixadas com 100 µL de BD Cytofix/Cytoperm™ pré-aquecido e incubadas por 10 minutos à 37 °C. Em seguida, após centrifugação à 250 x g por 8 minutos, o sobrenadante foi descartado e realizada a marcação de superfície celular com os anticorpos monoclonais anti- CD14, anti-CD3, anti-CD16, anti-CD20. Após incubação de 20 minutos à temperatura ambiente e protegido da luz, as células foram permeabilizadas com 750 µl de Perm Buffer III à 4 °C e incubadas por 30 minutos no gelo, protegidas da luz. Em seguida, as células foram lavadas com 3 mL de PBS, centrifugadas à 250 xg por 8 minutos e o sobrenadante foi descartado. Duas etapas de lavagem foram realizadas. Posteriormente, foi realizada a marcação intracelular com o anticorpo monoclonal anti- TLR9 e realizada incubação por 40 minutos protegido da luz. Foi realizada uma nova etapa de lavagem, o sobrenadante descartado e as células foram ressuspensas em 300 µL de Stain Buffer e realizada a aquisição no citômetro de fluxo. Após a etapa de permeabilização, foi adicionado mAB anti-TLR9 (BD, Pharmingen, San Diego, CA) e incubado à 4°C por 30 min e protegido da luz. Após a incubação, adicionou 2 mL de Perm/Wash 1x concentrado (BD, Cytofix/Cytoperm™ Becton Dickinson, Sunnyvale, CA) e centrifugou a 300 x g por 5 min a 20 °C (FACSVERSE, Becton Dickinson, Sunnyvale, CA). Foram adquiridos 50.000 eventos celulares e as análises dos resultados foram realizadas com o programa FACSSUÍTE (Becton Dickinson, Sunnyvale, CA) e expressas em Média de Intensidade de Fluorescência (MFI).

3 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Foi calculado o valor de p para a associação das variáveis Sócio-Demográficas, Antecedente de Ca de Pele, Exposições químicas, Fototipo de pele da Classificação de Fitzpatrick, UVB-S, e o CEC em área de Pele Fotoexposta em Adultos e idosos. Foram aplicados os testes qui-quadrado e Fisher. Para as variáveis Idade e IMC foi aplicado o teste t de Student. Foram consideradas associadas as variáveis com valor de $p < 0,05$.

Na análise da Média de Intensidade de Fluorescência (MFI) de TLR9 foi inicialmente aplicado o teste de normalidade de shapiro-wilk. Observou-se distribuição não normal da Expressão TLR9 pela MFI entre os grupos celulares, tendo sido expressa em mediana e interquartil (IQR: 25%-75%). Foi realizado o teste de *Mann-Whitney* para comparar valores de mediana entre grupos celulares. Foi adotado o nível de significância estatística de $p < 0.05$. A análise estatística foi realizada através do *graphpadprism v6.0* (Graphpad software, San Diego, CA).

4 RESULTADOS

4.1 Características clínicas e demográficas dos pacientes CEC e Controles

Observou-se a UVBS em 80% dos pacientes CEC e 12,5% dos Controles ($p < 0.0001$). Foram do sexo masculino, 73,4% dos pacientes CEC e 31,2% dos Controles ($p < 0,012$). A média de idade foi 70 (± 13) anos nos pacientes CEC e 47,2 ($\pm 12,5$) nos Controles ($p < 0,0001$). Os Fototipos de pele I e II da classificação de Fitzpatrick foi observado em 94,7% dos pacientes CEC e em 37,5% dos Controles ($p < 0,0001$). **Tabela 1.**

4.2 Análises da expressão de TLR9 nos pacientes CEC e controles

Na análise de expressão de TLR9 nos leucocitos circulantes, observou-se que a MFI de TLR9 em linfócitos totais foi diminuída nos pacientes com CEC quando comparado aos controles ($p < 0.04$). Não houve diferença estatística na MFI de TLR9 em leucócitos totais, monócitos, granulócitos e células B entre os pacientes CEC e controles, como mostra a **figura 1.**

4.3 Análises da expressão de TLR9 nos pacientes UVBS e UVBR

Foi observado que a MFI de TLR9 em leucócitos totais, linfócitos totais e células B foi reduzida nos pacientes UVBS quando comparados aos UVBR ($p < 0.01$, 0.004 e 0,01, respectivamente). Não houve diferença estatística na expressão de TLR9 em monocitos e granulocitos entre os grupos UVBS e UVBR, como mostra a **figura 2.**

5 DISCUSSÃO

Nesse estudo, observamos que a maioria dos pacientes com CEC apresentava UVBS, Fototipo I e II de Fitzpatrick, eram idosos e do sexo masculino. Nesses pacientes, a MFI da Expressão TLR9 em linfócitos totais do sangue periférico foi diminuída quando comparada aos controles. Os pacientes UVBS também apresentaram diminuição da MFI da Expressão TLR9 em leucócitos e linfócitos totais, e, em células B quando comparada aos UVBR.

A expressão TLR9 pode ser avaliada em células do sistema imune como monócitos, neutrófilos e linfócitos em sangue periférico e em queratinócitos da pele, mucosa, ou células epiteliais de revestimento do sistema Digestório, do pulmão, cervicais ou ainda células carcinomatosas. No nosso estudo medimos a MFI em sangue periférico de Casos CEC em pele fotoexposta de adultos e idosos e em Controles. Nas células periféricas do sistema imune, pudemos observar a Expressão TLR9 refletindo o microambiente tumoral de CEC em pele exposta à RUVB de Casos e de pele também exposta à RUVB de Controles sem CEC. [9]

Chamou-nos a atenção a reduzida Expressão TLR9 nos Linfócitos totais nos pacientes CEC em pele fotoexposta ao compararmos com Controles. A Expressão TLR9 estava mais intensamente reduzida em UVBS ao compararmos com os UVBR, em Linfócitos totais, Leucócitos totais e Células B, e, aventamos a hipótese de que a diminuição na expressão TLR9 pode estar mais fortemente prejudicada pela exposição à RUVB e pela UVBS. Os pacientes Controles e os UVBR caracterizaram-se pela maior Expressão TLR9 e apresentaram reatividade ao teste de contato avaliado entre 21 e 28 dias após a aplicação do antígeno DPCB em pele previamente irradiada, representativos da resistência à RUVB (UVBR), pela integridade do sistema imune inato e adaptativo.

Estão associados ao CEC a exposição crônica à RUVB e o efeito cumulativo, [27-29] e a UVBS, promovendo a infiltração de células e produção de citocinas pró-inflamatórias e metabólitos envolvidos na iniciação, promoção e progressão da oncogênese. [30- 31] Sabendo-se que a RUVB induz estresse oxidativo e CEC mediante ativação do “Nuclear Factor-Kb” (NF- κ B), e, sendo NF- κ B um fator de transcrição que regula a Expressão TLR9, a qual (Expressão TLR9), observamos estar reduzida em UVBS e no CEC em pele fotoexposta, sugerimos que, possíveis alterações com redução na transcrição do TLR9 via NF κ B, possam ocorrer pela exposição à RUVB em UVBS. [32, 12], Entretanto, alguns autores relataram ausência de TLR9 em epitélio não exposto à RUVB no CEC Cervical, portanto, indicando a possibilidade de outros fatores associados, além da exposição à RUVB e da UVBS. São necessárias pesquisas que investiguem outros fatores envolvidos com a resposta imune inata e

a Expressão TLR9 na carcinogênese do CEC em pele fotoexposta de adultos e idosos, que possam demonstrar o perfil de resposta em UVBS e UVBR, ou ausência de Expressão TLR9 ou anergia. [23]

Apesar da nossa população ser miscigenada observamos que as características de cor de pele, olhos e cabelos claros e predisposição às queimaduras e incapacidade de bronzeamento, previstas na Classificação de Fitzpatrick nos Fototipos I e II, predominaram em nossos resultados, sendo mais uma evidência da participação da RUVB associada ao risco de CEC, em caucasianos.

Foi observada que a faixa etária média de 70 anos caracterizou o grupo de pacientes CEC e aventamos a possibilidade de que a idade pode também ser um fator importante na redução da Expressão TLR9 no CEC em pele fotoexposta. A pele senescente apresenta alterações ultraestruturais em decorrência da idade e a nossa população de pacientes CEC tinham média de idade de 70 anos. [33] O CEC em pele fotoexposta ocorre mais frequentemente a partir do 60 anos, e, nessa faixa etária observam-se instabilidade anatômica da pele, além das alterações ultraestruturais e imunossenescência cutânea na população idosa. [34] Observam-se alterações na expressão e função dos TLRs em alguns tipos celulares sinalizando alteração na regulação do sistema imune no envelhecimento, e, em células dendríticas plasmocitárias (pDCs) humanas foi observado declínio da expressão TLR9 no envelhecimento. [35, 34]

A chance de ter CEC foi maior no sexo masculino, e, para Chen [24] há diferenças nas formas de exposição entre os sexos, sendo a exposição ao sol durante toda a vida mais relacionada com o risco de CEC em mulheres, enquanto que, a exposição solar de início precoce foi mais relevante para o risco de CEC no sexo masculino. São também relatados determinantes genéticos de risco de CPNM diferentes por gênero na supressão imunológica induzida pela RUVB. [36] Para Rudolph [37], a incidência do CEC está em ascensão em ambos os sexos em todo o mundo, entretanto, a ascensão é, predominantemente, no sexo feminino.

Diante dos resultados, concluímos nesse estudo que, há uma redução da Expressão TLR9, evidenciada em células do sistema imune, em sangue periférico, à MFI, no CEC em pele fotoexposta de adultos e idosos, e, mais intensamente em UVBS, indicando a possibilidade da implicação dos TLR9 nos mecanismos envolvidos na resposta imune inata deficiente à Exposição à RUVB e nos mecanismos da UVBS, e, também na tumorigênese do CEC em pele fotoexposta de adultos e idosos. A média de idade de 70 anos observada nos pacientes CEC pode também estar associada à deficiente Expressão TLR9.

São necessárias outras pesquisas com número maior de participantes que verifiquem a resposta imune inata via Expressão TLR9 no sangue periférico em UVBS e no CEC na pele fotoexposta de Adultos e Idosos.

6 DECLARAÇÃO DE CONFLITO DE INTERESSE

Os autores declararam não haver conflito de interesse

AGRADECIMENTOS

Nossos sinceros agradecimentos aos pacientes e familiares que contribuíram acreditando em novos conhecimentos científicos no câncer de pele, e em melhorias na saúde e na qualidade de vida das pessoas.

REFERÊNCIAS

- 1 B. K. Armstrong, A. Krickler, The epidemiology of UV induced skin cancer, J Photochem Photobiol B. 63 (2001) 8-18. Doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S1011-1344\(01\)00198-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1011-1344(01)00198-1)
- 2 Brasil, Ministério da Saúde, Estimativa 2014: incidência de câncer no Brasil, Brasília, 2014.
- 3 T. Yoshikawa, I. Kurimoto, J. W. Streilein, Tumour necrosis factor-alpha mediates ultraviolet light B-enhanced expression of contact hypersensitivity, Immunology. 76 (1992) 264-271.
- 4 I. Kurimoto, J. W. Streilein, Characterization of the immunogenetic basis of ultraviolet-B light effects on contact hypersensitivity induction, Immunology. 81 (1994) 352-8.
- 5 T. Yoshikawa, V. Rae, W. Bruins-Slot, J-W. Van den Berg, J. R. Taylor, J. W. Streilein, Susceptibility to effects of UVB Radiation on Induction of Contact Hypersensitivity as a Risk Factor for Skin Cancer in Humans, J Invest Dermatol. 95 (1990) 530-536.
- 6 H. G. Rebel, C. A. Bodmann, G. C. Van de Glind, F. R. Gruijl, UV-induced ablation of the epidermal basal layer including p53-mutant clones resets UV carcinogenesis showing squamous cell carcinomas to originate from interfollicular epidermis, Carcinogenesis. 33 (2012) 714–20. DOI: 10.1093/carcin/bgs004.

- 7 E. C. De Fabo, F. B. Noonan, Mechanism of immune suppression by ultraviolet irradiation in vivo. I. Evidence for the existence of a unique photoreceptor in skin and its role in photoimmunology, *J Exp Med.* 158 (1983) 84-98. DOI: 10.1084/jem.158.1.84.
- 8 C. Hernandez, P. Huebener, F. Robert, F Schwabe, Damage-associated molecular patterns in cancer: A double edged sword. *Oncogene.* 35 (2016) 5931–5941. DOI:10.1038/onc.2016.104.
- 9 B. Huang, J. Zhao, H. Li, K. L. He, Y. Chen, S. H. Chen, L. Mayer, J. C. Unkeless, H. Xiong, Toll-like receptors on tumor cells facilitate evasion of immune surveillance. *Cancer research.* 65 (2005) 5009–5014. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-0784
- 10 Y. Ben-Neriah, M. Karin, Inflammation meets cancer, with NF- κ B as the matchmaker. *Nat Immunol.* 12 (2011) 715-23. DOI: 10.1038/ni.2060.
- 11 J-P. Pradere, D. H. Dapito, R. H. Schwabe, The Yin and Yang of Toll-like Receptors in Cancer. *Oncogene.* 33 (2014) 3485–3495. DOI:10.1038/onc.2013.302.
- 12 F. Takeshita, K. Suzuki, S. Sasaki, N. Ishii, D. M. Klinman, K. J. Ishii, Transcriptional regulation of the human TLR9 gene, *J. Immunol.* 173(2004) 2552-2561.
- 13 J. Tian, A. M. Avalos, S-Y. Mao, B. Chen, K. Senthil, H. Wu, Toll-like receptor 9–dependent activation by DNA-containing immune complexes is mediated by HMGB1 and RAGE, *Nat. Immunol.* 8 (2007) 487 – 496.
- 14 C. Bangert, P. M. Brunner, G. Stingl G. Immune function of the skin. *Clin Dermatol.* 29 (2011) 360-76. DOI: 10.1016/j.clindermatol.2011.01.006.
15. S. K. S. Katiyar, S. D. Meleth, Sharma, Silymarin, a Flavonoid from Milk Thistle (*Silybum marianum L.*), Inhibits UV-induced Oxidative Stress Through Targeting Infiltrating CD11b⁺ Cells in Mouse Skin, *Photochem. Photobiol.* 84(2008) 266–271. DOI: 10.1111/j.1751-1097.2007.00241.x.
- 16 R. Sluyter, G. M. Halliday. Infiltration by inflammatory cell required for solar-simulated ultraviolet radiation enhancement of skin tumor growth. *Cancer Immunol. Immunother.* 50 (2001) 151-156. DOI: 10.1007/PL00006685
- 17 V. S. Kotrashetti, R. Nayak, K. Bhat, J. Hosmani, P. Somannavar, *Biotech Histochem.* 88 (2013) 311-322. DOI: 10.3109/10520295.2013.785592.

- 18 R. Min, L. Siyi, Y. Wenjun, L. Shengwen, A. Ow, W. Lizheng, Z. Chenping, Toll-like receptor-9 agonists increase cyclin D1 expression partly through activation of activator protein-1 in human oral squamous cell carcinoma cells, *Cancer Sci.* 103 (2012) 1938-45. DOI: 10.1111/j.1349-7006.2012.02394.x.
- 19 H. Frenzel, B. Hoffmann, C. Brocks, P. Schlenke, R. Pries, B. Wollenberg, Toll-like receptor interference in myeloid dendritic cell through head and neck cancer, *Anticancer Res.* 26 (2006) 4409-13.
- 20 J. Sheyhidin, G. Nabi, A. Hasim, R. P. Zhang, J. Ainiwaer, H. Ma, H. Wang, Over expression of TLR3, TLR4, TLR7 and TLR9 in esophageal squamous cell carcinoma, *World J Gastroenterol.* 17 (2011) 3745-51. DOI: 10.3748/wjg.v17.i32.3745.
- 21 L. Belmont, N. Rabbe, M. Antoine, D. Cathelin, C. Guignabert, J. Kurie, J. Cadranel, M. Wislez, Expression of TLR9 in tumor-infiltrating mononuclear cells enhance angiogenesis and is associated with a worse survival in lung cancer. *Int J Cancer.* 134 (2014) 765-77. DOI: 10.1002/ijc.28413.
- 22 A. Ghosh, A. Dasgupta, A. Bandyopadhyay, T. Ghosh, R. Dalui, S. Biswas, U. Banerjee, A. Basu, A study of the expression and localization of toll-like receptors 2 and 9 in different grades of cervical intraepithelial neoplasia and squamous cell carcinoma. *Exp Mol Pathol.* 99 (2015) 720-4. DOI: 10.1016/j.yexmp.2015.11.015.
- 23 M. M. Kumar, S. Adurthi, S. Ramachandran, G. Mukherjee, O. Joy, H. Krishnamurthy, S. Krishna, U. D. Bafna, D. K., D. K. Uma, R. S. Jayshree, Toll-like receptors 7, 8, and 9 expression and function in cervical cancer Langerhans cells: evidence of anergy, *Int. J. Gynecol. Cancer.* 23 (2013) 184-192. DOI: 10.1097/IGC.0b013e31827a2003.
- 24 X. Chen, S. Wang, L. Liu, Z. Chen, F. Qiang, Y. Kan, Y. Shen, J. Wu, H. Shen, Z. Hu, A genetic variant in the promoter region of Toll-like receptor 9 and cervical cancer susceptibility. *DNA Cell Biol.* 31 (2012) 766-71. DOI: 10.1089/dna.2011.1427.
- 25 W. Lee, J. J. Choi, E. S. Seo, M. J. Kim, W. Y. Kim, C. H. Choi, T. J. Kim, B. G. Kim, S. Y. Song, D. S. Bae, Increased toll-like receptor 9 expression in cervical neoplasia. *Mol Carcinog.* 46 (2007) 941-7. DOI: 10.1002/mc.20325.
- 26 I. Ahmad, E. Simanyi, P. Guroji, Toll-Like Receptor-4 deficiency enhance repair of ultraviolet radiation induced cutaneous DNA damage by nucleotide excision repair mechanism. *J Invest Dermatol.* 134 (2014) 1710-7. DOI: 10.1038/jid.2013.530.

- 27 U. Leiter, C. Garbe, Epidemiology of melanoma and nonmelanoma skin cancer--the role of sunlight, *Adv Exp Med Biol.* 624 (2008) 89-103. DOI: 10.1007/978-0-387-77574-6_8.
- 28 D. S. Rigel, R. J. Friedman, A. W. Kopf. Lifetime risk for development of skin cancer in the US population: current estimate is now 1 in 5. *J. Am. Acad. Dermatol.* 35 (1996) 1012–13. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0190-9622\(96\)90139-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0190-9622(96)90139-5).
- 29 D. S. Rigel, Cutaneous ultraviolet exposure and its relationship to the development of skin cancer, *J Am Acad Dermatol.* 58 (2008) S129-32. DOI: 10.1016/j.jaad.2007.04.034.
- 30 S. M. Meeran, T. Punathil , S. K., IL-12 deficiency exacerbates inflammatory responses in UV-irradiated skin and skin tumors, *J. Invest. Dermatol.* 128 (2008) 2716-2727. DOI: 10.1038/jid.2008.140.
- 31 Y. Kima, Y-Y. He, Ultraviolet radiation-induced non-melanoma skin cancer: Regulation of DNA damage repair and inflammation, *Genes Dis.* 1(2014) 188-198.
- 32 J. W Wang, J. Ouyang, J.Li. Loss of Tumor Suppressor p53 Decreases PTEN Expression and Enhances Signaling Pathways Leading to Activation of Activator Protein 1 and Nuclear Factor κ B Induced by UV Radiation. *Cancer Res.* 65 (2005) 6601-11. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-4184
- 33 F. Olivieri, A. D. Procopio, R. R. Montgomery, Effect of ageing on micro RNAs and regulation of pathogen recognition receptors. *Current Opinion in Immunology.* 29 (2014) 29-37. DOI: 10.1016/j.coi.2014.03.006.
- 34 Y. Jing, E. Shaheen, R. R. Drake, N. Chen, S. Gravenstein, Y. Deng, Aging is Associated with a numerical and Functional Decline in Plasmocitoid Dendritic Cells, whereas myeloid dendritic cells are relatively unaltered in human peripheral blood. *Hum Immunol.* 70 (2009) 777-784. DOI:10.1016/j.humimm.2009.07.005
- 35 A. C. Shaw, D. G. Goldstein, R. R. Montgomery, Dysregulated innate immune function in aging. *Nat Rev Immunol.* 13 (2013) 875-87. DOI: 10.1016/j.coi.2010.05.003.
- 36 M. M. Welsh, M. R. Karagas, J. K. Kuriger, A. Houseman, S. K. Spencer, A. E. Perry et al., Genetic Determinants of UV-Susceptibility in Non-Melanoma Skin Cancer, *PLoS ONE.* 6 (2011) 20019. DOI:10.1371/journal.pone.0020019.
- 37 C. Rudolph , M. Schnoor , N. Eisemann, Incidence trends of nonmelanoma skin cancer in Germany from 1998 to 2010. *J Dtsch Dermatol Ges.* 2015;13(8):788-797. doi: 10.1111/ddg.12690.

FIGURAS

Figura 1: Valores da média de intensidade de fluorescência (MFI) de TLR9 em leucócitos totais, linfócitos totais, monócitos, granulocitos e células B nos pacientes com CEC e controles. Foi realizado teste de normalidade de Shapiro Wilk. Os gráficos estão representados em mediana e interquartil 25-75%. Foi considerado significativo $P < 0.05$. ns: não significativo.

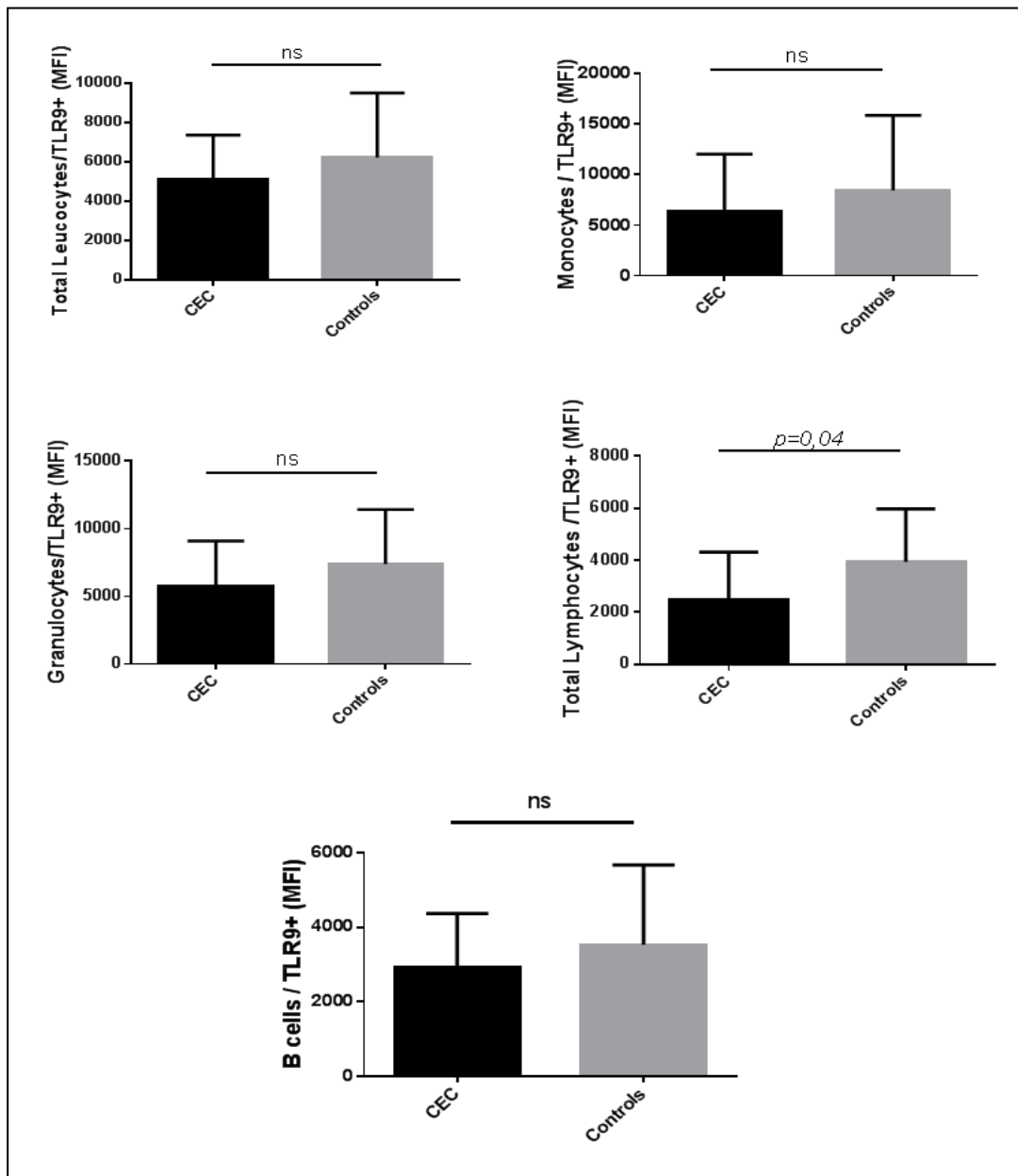


Figura 2: Valores da média de intensidade de fluorescência (MFI) de TLR9 em leucócitos totais, linfócitos totais, monócitos, granulócitos e células B nos pacientes UVBS e UVBR. Foi realizado teste de normalidade de Shapiro Wilk. Os gráficos estão representados em mediana e interquartil 25-75%. Foi considerado significativo $P < 0.05$. ns: não significativo

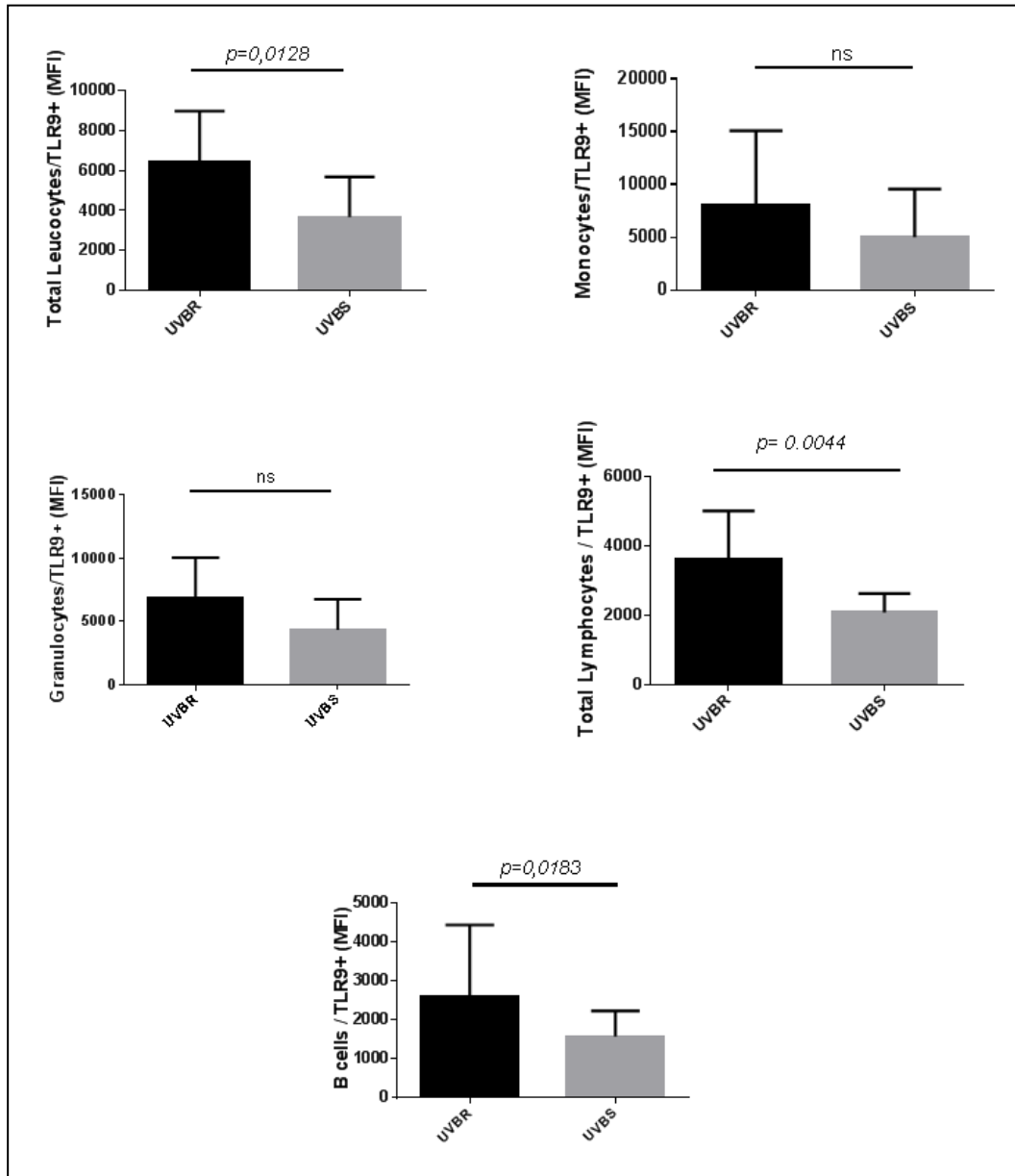


Tabela 1. Características sócio-demográficas, Histórico de câncer de pele na família, exposição química, queimadura por RUVB, Fototipo de pele de Fitzpatrick, UVBS e o CEC em Casos e Controles analisados

Variáveis	CEC		p-valor
	Sim (n = 19)	Não (n = 16)	
UVB			
Resistente	3 (20,0%)	14 (87,5%)	0,000
Suscetível	12 (80,0%)	2 (12,5%)	
Sexo: Masculino	14 (73,4%)	5 (31,2%)	0,012
Idade	70,0 ± 13,3	47,2 ± 12,5	0,000
História de Câncer de pele na família			
Não	0 (-)	3 (18,7%)	0,101
Sim	19 (100%)	13 (81,3%)	
Carga tabágica (anos/maço)			
Nunca fumou	9 (60,0%)	14 (87,5%)	0,060
Menos de 35	6 (40,0%)	1 (6,3%)	
35 e mais	0 (-)	1 (6,3%)	
Exposição ao arsênico			
Não	1 (5,3%)	0 (%)	0,352
Sim	18 (94,7%)	16 (100%)	
Profissão^a			
Outras profissões	12 (63,2%)	14 (87,5%)	0,101
Agricultura	7 (36,8%)	2 (12,5%)	
Fototipo de pele da classificação de Fitzpatrick			
III a VI	1 (5,3%)	10 (62,5%)	0,000
I e II	18 (94,7%)	6 (37,5%)	
Já teve queimadura			
Não	14 (73,7%)	13 (81,2%)	0,595
Sim	5 (26,3%)	3 (18,8%)	

7 CONCLUSÃO

Há associação entre a positividade do HPV Beta em pele fotoexposta e no CEC e pele fotoexposta.

A Expressão TLR9 está reduzida no CEC em pele fotoexposta e em UVBS.

São necessárias novas pesquisas com número maior de participantes.

REFERÊNCIAS

- AKGUL, B. et al. UVB irradiation stimulates the promoter activity of the high-risk, cutaneous human papillomavirus 5 and 8 in primary keratinocytes. *Arch. virol.*, Wien, v. 150, n. 1, p. 145-151, Jan. 2005.
- AKGÜL, B.; COOKE, J. C.; STOREY, A. HPV-associated skin disease. *J. pathol.*, London, v. 208, n. 2, p. 165-175, Jan. 2006.
- ANTONSSON, A. et al. The Ubiquity and Impressive Genomic Diversity of Human Skin Papillomaviruses Suggest a Commensalic Nature of These Viruses. *J. virol.*, Washington, v. 74, n. 24, p. 11636-11641, 2000.
- ARMSTRONG, B. K.; KRICKER, A. The epidemiology of UV induced skin cancer. *J. photochem. photobiol.*, Lausanne, v. 63, n. 1-3, p. 8-18, 2001.
- ASGARI, M. M. et al. Detection human papillomavirus DNA in cutaneous squamous cell carcinoma among immunocompetent individuals. *J. invest. dermatol.*, Baltimore, v. 128, n. 6, p. 1409-1417, 2008.
- AUBIN, F. et al. Non-melanoma skin cancers and human papillomavirus. *Ann. dermatol. venereol.*, Paris, v. 130, n. 12, p. 1131-1138, Dec. 2003.
- BAADSGAARD, O. In vivo ultraviolet irradiation of human skin results in profound perturbation of the immune system. Relevance to ultraviolet-induced skin cancer. *Arch. dermatol.*, Chicago, v. 127, n. 1, p. 99-109, 1991.
- BACCI, S.; ALARD, P.; STREILEIN, J. W. Evidence that ultraviolet B radiation transiently inhibits emigration of langerhans cells from exposed epidermis, thwarting contact hypersensitivity induction. *Eur. j. immunol.*, Wienhein, v. 31, n. 12, p. 3588- 3594, Dec. 2001.
- BARZILAI, A. et al. Expression of p53 in the evolution of squamous cell carcinoma: correlation with the histology of the lesion. *J. am. acad. Dermatol.*, St. Louis, v. 57, n. 4, p. 669-676, 2007.
- BAVINCK, J. N. B. et al. Keratotic Skin Lesions and Other Risk Factors Are Associated with Skin Cancer in Organ-Transplant Recipients: A Case-Control Study in The Netherlands, United Kingdom, Germany, France and Italy. *J. invest. dermatol.*, Baltimore, v. 127, n. 7, p. 1647-1656, 2007.
- BELMONT, L. et al. Expression of TLR9 in tumor-infiltrating mononuclear cells enhances angiogenesis and is associated with a worse survival in lung cancer. *Int. j. cancer*. New York, v. 134, n. 4, p. 765-777, Feb. 2014.
- BERGFELT, L. Langerhans Cells, Immunomodulation and Skin Lesions. A Quantitative, morphological and clinical study. *Acta dermat. venereol. suppl. (Stockh)*, Oslo, v.180, p. 1-37, 1993.

- BERKOUT, R. T.; BOUWES–BAVINCK, J. N.; Ter-SCHEGGETI, T. Persistence of human papillomavirus DNA in benign and premalignant skin lesions from renal transplant recipients. *J. clin. microbiol.*, Whashington, v. 38, n. 6, p. 2087-2096, 2000.
- BUCANA, C. D. et al. Phenotip and ultrastructural properties of antigen presenting cells involved in contact sensitization of normal and UV-irradiated mice. *J. invest. dermatol.*, Baltimore, v. 102, n. 6, p. 928-933, 1994.
- CHADHA, K. C. et al. Interferosns and Interferon Inhibitory activity in disease and therapy. *Exp. Biol. Med.*, Basel, v. 229, n. 4, p. 285-290, 2004.
- CHEN, X. et al. A genetic variant in the promoter region of Toll-like receptor 9 and cervical cancer susceptibility. *DNA Cell Biol.*, New York, v. 31, n. 5, p. 766-771, May 2012.
- CRAWFORD, L. V.; CRAWFORD, E. M. A comparative study of polioma viruses. *Virology*, New York, v. 21, p. 258-263, 1963.
- De FABO, E. C.; NOONAN, F. P. Mechanism of immune suppression by ultraviolet irradiation in vivo. I. Evidence for the existence of a unique photoreceptor in skin and its role in photoimmunology. *J. exp. med.*, New York, v. 158, n. 1, p. 84-98, 1983.
- De KONING, M. N. C. et al. Prevalence and associated factors of betapapillomavirus infections in individuals without cutaneous squamous cell carcinoma. *J. gen. virol.*, London, v. 90, pt. 7, p. 1611-1621, 2009.
- De VILLIERS, E. M. et al. Classification of papillomaviruses. *Virology*, New York, v. 324, n. 1, p. 17-27, 2004.
- DEGRUIJL, F. R.; Van KRANEN, H. J.; MULLENDERS, L. H. UV-induced DNA damage, repair, mutations and oncogenic pathways in skin cancer. *J. photochem. photobiol. B.*, Lausanne, v. 63, n. 1/3, p. 19-27, Oct. 2001.
- DERANCOURT, C. et al. Oncogenic Human papillomaviruses in extragenital Bowen Disease revealed by in situ hybridization. *Ann. dermatol. venereol.*, Paris, v. 128, n. 6/7, p. 715-718, 2001.
- DOORBAR, J. The papillomaviruses life cycle. *J. clin. virol.* Amsterdam, v. 32, Suppl. 1, p. S7-15, 2005.
- FETT-CONTE, A. C.; SALLES, A. B. C. F. A importância do gene p53 na carcinogênese humana. *Rev. bras. hematol. hemoter.*, São Paulo, v. 24, n. 2, p. 85-89, 2002.
- FITZPATRICK, T B. The validity and practicality of sun reactive skin types I through IV. *Arch. dermatol.*, Chicago, v. 124, n. 6, p. 869-871, 1988.
- FORSLUND, O. et al. Cutaneous Human Papillomavirus found in sun-exposed skin: betapapillomavirus species 2 predominates in squamous cell carcinoma. *J. infect. dis.*, Chicago, v. 196, n. 6, p. 876-883, 2007.

FORSLUND, O.; LY, H.; HIGGINS, G. A broad spectrum of Human papillomavirus types is present in the skin of Australian patients with non-melanoma skin cancers and solar keratosis. *Br. j. dermatol.*, London, v. 149, n. 1, p. 64-73, July 2003.

FRENZEL, H. et al. Toll-like receptor interference in myeloid dendritic cells through head and neck cancer. *Anticancer res.*, Athens, v. 26, n. 6B, p. 4409-4413, Nov./Dec. 2006.

GHOSH, A. et al. A study of the expression and localization of toll-like receptors 2 and 9 in different grades of cervical intraepithelial neoplasia and squamous cell carcinoma. *Exp. mol. pathol.*, New York, v. 99, n. 3, p. 720-724, Dec. 2015.

GISSMANN, L.; PFISTER, H.; ZURHAUSEN, H. Human papilloma viruses (HPV): Characterization of four different isolates. *Virology*, New York, v. 76, n. 2, p. 569-580, Feb. 1977.

GOADE, D. E. Ultraviolet light induces reactivation in a murine model of cutaneous herpes simplex virus-1 infection. *Photochem. Photobiol.*, Oxford, v. 74, n. 1, p. 108-114, June 2001.

HAHN, H. et al. The patched signaling pathway in tumorigenesis and development: lessons from animal models. *J. mol. med.*, Heidelberg, v. 77, n. 6, p. 459-468, 1999.

HARWOOD, C. A. et al. Human papillomavirus infection and non-melanoma skin cancer in immunosuppressed and immunocompetent individuals. *J. med. virol.*, New York, v. 61, n. 3, p. 289-297, July 2000.

HARWOOD, C. A. T. et al. Increased risk of skin cancer associated with the presence of epidermodysplasia verruciformis human papillomavirus types in normal skin. *Br. j. dermatol.*, London, v. 150, n. 5, p. 949-957, May 2004.

HASIMU, A. et al. Expressions of Toll-like receptors 3, 4, 7, and 9 in cervical lesions and their correlation with HPV16 infection in Uighur women. *Chin. j. cancer*, Austin, v. 30, n. 5, p. 344-350, May 2011.

HENDERSON, M. T. et al. Smoking behavior and association of melanoma and nonmelanoma skin cancer in the Women's Health Initiative. *J. Am. Acad. Dermatol.*, St. Louis, v. 72, n. 1, p. 190-191, 2015.

HERNANDEZ, C.; HUEBENER, P.; SCHWABE, R. F. Damage-associated molecular patterns in cancer: a double-edged sword. *Oncogene*, Basingstoke, v. 35, n. 46, p. 5931-5941, 2016.

HUANG, X.; YANG, Y. Targeting the TLR9-MyD88 pathway in the regulation of adaptive immune responses. *Expert opin. ther. targets*, London, v. 14, n. 8, p. 787-796, 2010.

IFTNER, A. et al. The prevalence of Human papillomaviruses genotypes in non-melanoma skin cancers of nonimmunossupressed individuals identifieis high-risk genital types as possible risk factors. *Cancer res.*, Baltimore, v. 63, n. 21, p. 7515-7519, 2003.

ILMARINEN, T. et al. Low expression of nuclear Toll-like receptor 4 in laryngeal papillomas transforming into squamous cell carcinoma. *Otolaryngol. head neck surg.*, Rochester, v. 151, n. 5, p. 785-790, Nov. 2014.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. *Pele não melanoma*. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pele_ao_melanoma>. Acesso em: 24 mar. 2016.

IVANOV, S. et al. A novel role for HMGB1 in TLR9-mediated inflammatory responses to CpG-DNA. *Blood*, New York, v. 110, n. 6, p. 1970-1981, 2007.

JOHNSON, K. E. et al. Ultraviolet light exposure stimulates HMGB1 release by keratinocytes. *Arc. dermatol. Res.* Berlin, v. 305, n. 9, p. 805-815, 2013.

KARAGAS, M. R. et al. Human papillomavirus infection and incidence of squamous cell and basal cell carcinomas of the skin. *J. Natl. Cancer Inst.*, Cary, v. 98, n. 6, p. 389-395, 2006.

KASAHARA, S. et al. UVB irradiation suppresses cytokine production and innate Cellular immune function in mice. *Cytokine*, San Diego, v. 14, n. 2, p. 104-111, Apr. 2001.

KIM, H. et al. Loss of hairless confers susceptibility to UVB-induced tumorigenesis via disruption of NF-kappaB signaling. *PLoS One*, San Francisco, v. 7, n. 6, p. e39691, 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3382590/>>. Acesso em: 22 mar. 2016.

KONING, M. et al. Evaluation of a Novel Highly Sensitive, Broad-Spectrum PCR-Reverse Hybridization Assay for Detection and Identification of Beta-Papillomavirus DNA. *J. clin. microbiol.*, Washington, v. 44, n. 5, p. 1792-1800, May 2006.

KOTRASHETTI, V. S. et al. Immunohistochemical expression of TLR4 and TLR9 in various grades of oral epithelial dysplasia and squamous cell carcinoma, and their roles in tumor progression: a pilot study. *Biotech. histochem.*, Baltimore, v. 88, n. 6, p. 311-322, Aug. 2013.

KUMAR, M. M. et al. Toll-like receptors 7, 8, and 9 expression and function in primary human cervical cancer Langerhans cells: evidence of anergy. *Int. j. gynecol. cancer*. Cambridge, v. 23, n. 1, p. 184-192, Jan. 2013.

KURIMOTO, I.; STREILEIN, J. W. Characterization of the immunogenetic basis of ultraviolet-B light effects on contact hypersensitivity induction. *Immunology*, Oxford, v. 81, n. 3, p. 352-358, 1994.

KURIMOTO, I.; KITAZAWA, T.; STREILEIN, J. W. Studies of delayed systemic effects of ultraviolet Radiation (UVR) on the induction of contact hypersensitivity. *Immunol.*, Oxford, v. 99, n. 1, p. 134-140, Jan. 2000.

LEE, B. N. et al. Depressed type 1 Cytokine synthesis by superantigen-activated CD4+ T cells of women with human papillomavirus – related high-grade squamous intraepithelial lesions. *Clin. diagn. lab. immunol.*, Washington, v. 11, n. 2, p. 239-244, 2004.

- LEE, J. W. et al. Increased toll-like receptor 9 expression in cervical neoplasia. *Mol. carcinog.*, New York, v. 46, n. 11, p. 941-927, Nov. 2007.
- LEI, U.; MASMAS, T. N.; FRENTZ, G. Occupational non-melanoma skin câncer. *Acta dermat. venerol.*, Stockholm, v. 81, n. 6, p. 415-417, 2001.
- LEITER, U.; GARBE, C. Epidemiology of melanoma and nonmelanoma skin cancer--the role of sunlight. *Adv. exp. med. biol.*, New York, v. 624, p. 89-103, 2008.
- LEWIS, J. M. et al. Langerhans Cells Facilitate UVB-induced Epidermal. *J. invest. dermatol.*, Baltimore, v. 135, n. 11, p. 2824-2833, 2015.
- LETO, M. G. P. et al. Human papillomavirus infection: etiopathogenesis, molecular biology and clinical manifestations. *An. bras. dermatol.*, Rio de Janeiro, v. 86, n. 2, p. 306-317, 2011.
- LEVINE, A. J. The common mechanisms of transformation by the small DNA tumor viruses: The inactivation of tumor suppressor gene products: p53. *Virology*, New York, v. 384, n. 2, p. 285-293, Feb. 2009.
- LICHTER, M. D. et al. Therapeutic ionizing radiation and incidence of basal cell carcinoma and squamous cell carcinoma. The New Hampshire Skin Cancer Study Group. *Arch. dermatol.*, Chicago, v. 136, n. 8, p. 1007-1011, 2000.
- LOWY, D. R.; HOWLEY, P. M. Papillomaviruses. In: FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (Ed.). *Fields virology*. 4. ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 2001. p. 2231-2264.
- MALINA, L. Effect of ultraviolet radiation on the immune system and the effect of exogenous photochemoprotective agents on the ultraviolet. *Cas. lek. cesk.*, Praha, v. 141, n. 11, p. 338-342, June 2002.
- MALITT, K. A. et al. An analysis of clustering of betapapillomavirus antibodies. *J. virol.*, Washington, v. 91, pt. 8, p. 2062-2067, Apr. 2010.
- MARCUZZI, G. P. et al. Spontaneous tumor development in Human papillomavirus type 8 e 6 transgenic mice and rapid induction by UV-light exposure and wounding. *J. gen. virol.*, New York, v. 90, pt. 2, p. 2855-2864, 2009.
- MARINESCU, A. et al. P53, p16 and immunossupression in cutaneous squamous cell carcinoma and its precursos lesions. *Rom. j. morphol. embryol.*, Romania, v. 57, n. 2, Suppl., p. 691-696, 2016.
- MEERAN, S. M.; PUNATHIL, T.; KATIYAR, S. K. Interleukin-12-Deficiency Exacerbates Inflammatory Responses in UV-Irradiated Skin and Skin Tumors. *J. Invest. Dermatol.*, Baltimore, v. 128, n. 11, p. 2716-2727, 2008.
- MIN, R. et al. Toll-like receptor-9 agonists increase cyclin D1 expression partly through activation of activator protein-1 in human oral squamous cell carcinoma cells. *Cancer sci.*, Tokyo, v. 103, n. 11, p. 1938-1945, Nov. 2012.

NASSER, N. UVB: suscetibilidade no melanoma maligno. *An. Bras. Dermatol.*, Rio de Janeiro, v. 85, n. 6, p. 843-848, dez. 2010

NGIOW, S. F.; TENG, M. W.; SMYTH, M. J. A balance of interleukin-12 and -23 in cancer. *Trends Immunol.*, Oxford, v. 34, n. 11, p. 548-555, 2013.

NINDL, I.; GOTTSCHLING, M.; STOCKFLETH, E. Human papillomaviruses and non-melanoma skin cancer: basic virology and clinical manifestations. *Dis. markers*, Chichester, v. 3, n. 4, p. 247-259, 2007.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. *Human papillomaviruses*. Lion, 2007. (IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, n. 90).

ORTH, G. Human papillomaviruses associated with Epidermodisplasia Verruciformes in Non-Melanoma Skin Cancer: Gulty or innocent? *J. invest. dermatol.* Baltimore, v. 125, n. 1, p. 12-13, 2005.

PACINI, L. et al. Downregulation of Toll-Like Receptor 9 Expression by Beta Human Papillomavirus 38 an Implications for Cell Cycle Control. *J. virol.*, Whashington, v. 89, n. 2, p. 11396 – 11405, 2015.

PLASMEIJER, E. I. et al. Persistence of Betapapillomavirus Infections as a Risk Factor for Actinic Keratoses, Precursor to Cutaneous Squamous Cell Carcinoma. *Cancer res.*, Baltimore, v. 69, n. 23, p. 8926-8931, Dec. 2009.

PRADERE, J. P.; DAPITO, D. H.; SCHWABE, R. F. The Yin and Yang of Toll-like receptors in cancer. *Prade ncogene*, Basingstoke, v. 33, n. 27, p. 3485-3495, 2014.

PROBY, C. M. et al. A Case-Control Study of Betapapillomavirus Infection and Cutaneous Squamous Cell Carcinoma in Organ Transplant Recipients. *Am. j. transplant.*, Copenhagen, v. 11, n. 7, p. 1498-1508, July 2011.

PURDIE, K. J. et al. Human Papillomavirus Gene Expression in Cutaneous Squamous Cell Carcinomas from Immunossupressed and Immunocompetent Individuals. *J. invest. dermatol.*, Baltimore, v. 125, n. 1, p. 98-107, July 2005.

PURDIE, K. J. et al. The promoter of a novel *Human papillomavirus* (HPV 77) associated with skin cancer displays UV responsiveness, which is mediated through a consensus p53 binding sequence. *EMBO J.*, Oxford, v. 18, n. 19, p. 5359-5369, 1999.

QIU, F. et al. Activation of cytokine-producing and antitumor activities of natural killer cells and macrophages by engagement of Toll-like and NOD-like receptors. *Innate Immun.*, Los Angeles, v. 17, n. 4, p. 375-87, Aug. 2011.

RAMÍREZ-SALAZAR, E. et al. HPV16 E2 could act as down-regulator in cellular genes implicated in apoptosis, proliferation and cell differentiation. *J. virol.*, Washington, v. 8, p. 247, 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3127837/pdf/1743-422X-8-247.pdf>>. Acesso em: 15 nov. 2016.

REBEL, H. G. et al. UV-induced ablation of the epidermal basal layer including p53-mutant clones resets UV carcinogenesis showing squamous cell carcinomas to originate from interfollicular epidermis. *Carcinogenesis*, Oxford, v. 33, n. 3, p. 714–720, Mar. 2012.

RIEDL, E. et al. Functional involvement of E-cadherin in TGF-beta 1-induced cell cluster formation of in vitro developing human Langerhans-type dendritic cells. *J. immunol.*, Baltimore, v. 165, n. 3, p. 1381-1386, Aug. 2000.

RIGEL, D. S.; FRIEDMAN, R. J.; KOPF, A. W. Lifetime risk for development of skin cancer in the US population: current estimate is now 1 in 5. *J. Am. Acad. Dermatol.*, St Louis, v. 35, n. 6, p. 1012-3, Dec. 1996.

RODRIGUES, M. M. et al. A UVB-Suscetibilidade como fator de risco para o desenvolvimento da hanseníase virchowiana. *An. bras. dermatol.*, Rio de Janeiro, v. 85, n. 6, p. 835-842, 2010.

ROSALES-CASTILLO, J. A. et al. Arsenic exposure and human papillomavirus response in non-melanoma skin cancer Mexican patients: a pilot study. *Int. arch. occup. environ. health.*, Berlin, v. 77, p. 418–423, 2004.

SCHMITT, J. et al. Amplification of bovine papillomavirus DNA by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, ultraviolet radiation, or infection with herpes simplex virus. *Virology*, New York, v. 172, n. 1, p. 73-81, 1989.

SHAMANIN, V. et al. Human Papillomavirus Infections in Nonmelanoma Skin Cancers From Renal Transplant Recipients and Nonimmunosuppressed Patients. *J. Natl. Cancer Inst.*, Bethesda, v. 88, n. 12, p. 802-811, June, 1996.

SHEYHIDIN, I. et al. Overexpression of TLR3, TLR4, TLR7 and TLR9 in esophageal squamous cell carcinoma. *World j. gastroenterol.*, Beijing, v. 17, n. 32, p. 37-45, Aug. 2011.

SOUSA, S. R. P. et al. Uma perspectiva mundial do carcinoma de células escamosas de pele. *Rev. ciênc. méd. biol.*, Salvador, v. 8, n. 1, p. 91-97, jan./abr. 2009.

STERLING, J. C. Human papillomaviruses and skin cancer. *J. clin. virol.*, Amsterdam, v. 32, Suppl. 1, p. S67-71, Mar. 2005.

STREILEIN, J. W.; ALARD, P.; NIIZEKI, H. A new concept of skin-associated lymphoid tissue (SALT): UVB light impaired cutaneous immunity reveals a prominent role for cutaneous nerves. *Keio j. med.*, Tokio, v. 48, n. 1, p. 22-77, Mar. 1999.

STRUIJK, L. et al. Markers of cutaneous human papillomavirus infection in individuals with tumor-free skin, actinic keratoses, and squamous cell carcinoma. *Cancer epidemiol. biomarkers prev.*, Philadelphia, v. 15, n. 3, p. 529-535, Mar. 2006.

STRUIJK, L. et al. Presence of human papillomavirus DNA in plucked eyebrow hairs is associated with a history of cutaneous squamous cell carcinoma. *J. invest. dermatol.*, Baltimore, v. 121, n. 6, p. 1531-1535, Dec. 2003.

TAYLOR, J. R. et al. Interrelationship between ultraviolet light and recurrent herpes simplex infections in man. *J. Dermatol. Sci.*, Amsterdam, v. 8, n. 3, p. 224-232, 1994.

THOMPSON, E. A et al. C/EBP α expression is downregulated in human nonmelanoma skin cancers and inactivation of C/EBP α confers susceptibility to UVB-induced skin squamous cell carcinomas. *J. Invest. Dermatol.*, Baltimore, v. 131, n. 6, p. 1339-1346, 2011.

TYRING, S. K. Human papillomavirus infections: epidemiology, pathogenesis, and host immune response. *J. Am. Acad. Dermatol.*, St Louis, v. 43, n. 1, pt. 2, p. S18-26, July 2000.

VERMEER, M. et al. Effects of ultraviolet B light on cutaneous immune responses of humans with deeply pigmented skin. *J. invest. dermatol.*, Baltimore, v. 97, n. 4, p. 729-734, Oct. 1991.

VERMEER, M.; STREILEIN, J. W. Ultraviolet B light-induced alterations in epidermal Langerhans cells are mediated in part by tumor necrosis factor- α . *Photodermatol. photoimmunol. photomed.*, Copenhagen, v. 7, n. 6, p. 258-265, Dec. 1990.

VIARISIO, D. et al. E6 and E7 from Beta Hpv38 Cooperate with Ultraviolet Light in the Development of Actinic Keratosis-Like Lesions and Squamous Cell Carcinoma in Mice. *PLoS pathog.*, San Francisco, v. 7, n. 7, p. 10021-10025, July 2011.

WEISSENBORN, S. J. et al. Human papillomavirus-DNA loads in actinic keratoses exceed those in non-melanoma skin cancers. *J. invest. dermatol.*, Baltimore, v. 125, n. 1, p. 93-97, July 2005.

WELSH, M. M. et al. Genetic Determinants of UV-Susceptibility in Non-Melanoma Skin Cancer. *PLoS one*, San Francisco, v. 6, n. 7, p. e20019, 2011. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0020019>>. Acesso em: 15 set. 2016.

WELSH, M. M. et al. Genetic Determinants of UV-Susceptibility in Non-Melanoma Skin Cancer. *PLoS one*, San Francisco, v. 6, n. 7, p. e20019, 2011. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0020019>>. Acesso em: 15 set. 2016.

YOSHIKAWA T. et al. Susceptibility to Effects of UVB Radiation on Induction of Contact Hypersensitivity as a Risk Factor for Skin Cancer in Humans. The Journal of Investigative Dermatology. *J. Invest. Dermatol.*, Baltimore, v. 95, n. 5, p. 530-536, 1990.

YOSHIKAWA, T.; KURIMOTO, I.; STREILEIN, J. W. Tumour necrosis factor- α mediates ultraviolet light B-enhanced expression of contact hypersensitivity. *Immunology*, Oxford, v. 76, n. 2, p. 264-271, June 1992.

YOSHIKAWA, T.; STREILEIN, J. W. Genetic basis of the effects of ultraviolet light B on cutaneous immunity. Evidence that polymorphism at the Tnfa and Lps loci governs susceptibility. *Immunogenetics*, New York, v. 32, n. 6, p. 398-405, 1990.

ZIEGLER, A et al. Sunburn and p53 in the onset of skin cancer. *Nature*, London, v. 372, n. 6508, p. 773-776, 1994.

ZURHAUSEN, H. Human papillomaviruses and their possible role in squamous cell carcinomas. *Curr. top. microbiol. immunol.*, Heidelberg, v. 78, p. 1-30, 1977.

APÊNDICE A – ARTIGOS EM INGLÊS

ARTICLE 1

Ultraviolet B susceptibility and Beta-HPV as Risk Factors for Squamous Cell Carcinoma on Photo-exposed Skin in Adults and Older People

Authors:

Mecciene Mendes Rodrigues^{1, 2, 3, 6}

Julia Smith Cavalcante⁴

Joana D'arc Rozendo dos Santos⁴

Sandra Elizabeth Barbosa da Silva⁴

Danyelly Bruneska Gondim Martins⁴

Ricardo Arraes de Alencar Ximenes^{1,5}

¹Postgraduate Program in Tropical Medicine, Center for Health Sciences (CCS), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, Pernambuco, Brazil

²Hospital de Câncer de Pernambuco - Sociedade Pernambucana de Combate ao Câncer, (HCP), Recife, Brazil.

³Professor of Dermatology at the Agreste Academic Center - Nucleus of Life Sciences - Universidade Federal de Pernambuco – Caruaru - Brazil

⁴Keizo Asami Immunopathology Laboratory - Universidade Federal de Pernambuco - Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) – Recife - Brazil.

⁵ Universidade de Pernambuco, Recife, Pernambuco – Brazil

⁶Professor of the postgraduate course in integral health – Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira – IMIP.

Corresponding author:

Mecciene Mendes Rodrigues

Agreste Academic Center - Nucleus of Life Sciences - Universidade Federal de Pernambuco – Caruaru - Brazil

Rodovia BR-104, Km 59, s/n - Nova Caruaru, Caruaru - PE, 55002-970

Telefone: + 55 81 99167-9416

E-mail: mecciene@gmail.com

Abstract

Background: Ultraviolet B susceptibility (UVBs) is a risk factor for squamous cell carcinoma (SCC), and there are reports of beta-HPV (β -HPV) associated with SCC on photo-exposed skin of immunocompetent patients, which need to be clarified.

Objective: To verify UVBs and β -HPV associated with SCC on the photo-exposed skin of adults and older people at a referral service in Recife-Brazil.

Methods: This was a case-control study. We calculated the crude and adjusted odds ratio, a CI of 95% and the p-value for the association of socio-demographic variables, UVBs and β -HPV with SCC on the photo-exposed skin of adults and older people.

Results: Sixty-three patients were diagnosed with SCC on photo-exposed skin (64.6% Stages I and II). After the multivariate analysis, the following items remained in the final model: UVBs ($p<0,015$), positivity for at least one subtype of β -HPV on photo-exposed skin ($p<0,01$), Fitzpatrick skin types I and II ($p<0,001$), burns before the age of 20 ($p<0,001$) and being male ($p<0,001$).

Limitations: The sample size; identifying neither the β -HPV subtypes, nor the viral activity.

Conclusion: UVBs and positivity for at least one subtype of β -HPV on photo-exposed skin are risk factors for SCC.

Key words: UVB Radiation; UVBs; Sunburn; beta-HPV; SCC; AK; NMSC; Odds Ratio; Fitzpatrick skin types.

INTRODUCTION

Exposure to ultraviolet radiation B (UVRB) remains the main risk factor for non-melanoma skin cancers (NMSC) in Caucasians;¹⁻³ and squamous cell carcinoma (SCC) is the second most prevalent within the group, corresponding to around 20% of NMSCs in Brazil.⁴ SCC is increasing worldwide,⁵ depending on exposure to UVRB,^{6,7} the geographical location,⁸ or some occupational categories.⁹ However, it has been observed that being ultraviolet B sensitive (UVBs) is a better indicator for the risk of SCC.¹⁰

The phenotypic trait of UVBs is observed in more than 90% of patients with SCC, against only 40% of the population.^{11,12} In UVBs there is a deficiency in the innate and adaptive immune response when exposed to minimum doses of ultraviolet B radiation (UVBR), twice the minimum erythematous dose (MED), due to genetic variability. Acute exposures suppress cell-mediated immunity (CMI) and contact hypersensitivity (CH) with deficits in the recognition of new antigens and immunological memory, and a predisposition to certain infections by intracellular pathogens, such as relapsing herpes simplex^{12,13,14,15} and Virchowian leprosy.¹⁶ In the carcinogenesis of UVBs individuals, cells that have suffered damage to their DNA through UVBR express a mutation in the tumor suppressor gene p53, with a loss of apoptosis and the consequent induction of SCC.^{6,17,18}

The major risk factor for cutaneous SCC is exposure to UVBR, with an association of beta-human papillomavirus (β -HPV) with SCC on skin exposed to UVBR, in immunosuppressed patients and in patients with epidermodysplasia verruciformis (EV). In non-immunosuppressed and non-EV patients, clarification is required on whether there is an association of β -HPV with SCC and also whether β -HPV is associated with photo-exposed skin. There have been reports of an association between β -HPV and SCC on photo-exposed skin and β -HPV with photo-exposed skin¹⁹ and some studies have not demonstrated a difference in the prevalence of cutaneous HPV in photo-exposed skin, such as Harwood et al.²⁰ More recently, one study determined the prevalence of cutaneous HPV on several types of benign skin lesions, actinic keratosis (AK), SCC and BCC, and observed that β -HPV was the most frequent on all lesions, and was observed in all cases of AK and SCC, which were positive for HPV; no type-specific association was observed.²¹

Non-immunosuppressed and non-EV individuals may require additional factors in order to become predisposed to infection and to the persistence of β -HPV on photo-exposed skin, and therefore need to be clarified. In this study our proposal was to investigate the risk

of UVBs and the presence of β -HPV associated with NMSC, of the SCC type, on photo-exposed skin of adults and older people, which have not been reported in the literature.

METHODS

Patients

Patients were selected at the dermatology outpatient clinic of the Hospital de Câncer de Pernambuco (HCP), and were divided into two groups:

- a) Patient Cases: patients with NMSC, type SCC.
 - b) Patient Controls: patients without skin cancer, as defined by the exclusion criteria.
- (Figure 1)

Inclusion criteria for cases and controls

Aged 18 years or over

Exclusion criteria for cases and controls

- f) Patients presenting with other papillomatosis or verrucous cancers identified through clinical skin and mucosal examination;
- g) Patients presenting with immunosuppressive diseases, repeated skin or other infections, on corticosteroid therapy or using other immunosuppressants verified during anamnesis, physical examination, search in medical records and conducting laboratory tests;
- h) Pregnant women: verified with anamnesis and Beta-HCG test.

After being selected, patients were informed about the research and invited to participate. Those who agreed to participate signed the informed consent form (ICF).

Dermatoscopy

The dermatoscopic criteria applied by Zalaudek et al., 2012²².

Cutaneous and histopathological biopsy:

- c) SCC in situ
- d) Invasive SCC.

Irradiation with those who are UVBs

The protocol for exposure to UVBR and determining the minimal erythematous dose (MED) followed the protocol described by Yoshikawa et al.¹² Figure 2.

Material/Swab for PCR and identification of the β -HPV

A swab was taken from the top of the suspected SCC lesion and the photo-exposed area of the wrist and back of the hand, the latter being for both cases and controls. The material was stored at -80°.

Automated extraction of DNA

The collected skin swab samples were maintained in PBS buffer, stored at -20°C until they were used for DNA extraction. The QIASymphony DNA Mini Kit was used for automated DNA extraction through the QIASymphony SP automated system (Qiagen), following the manufacturer's instructions. All samples were submitted to a Proteinase K digestion step before being inserted into the extraction system. The diluted DNA concentration was evaluated on NanoDrop 2000 (Thermo Scientific™) and afterwards stored at -20°C.

Identification of HPV

The PM-PCR was performed using HPV specific primers from the beta-papillomavirus group, and was able to identify HPV5, 8, 9, 12, 14, 15, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 36, 37, 38, 47, 49, 75, 76, 80, 93, 96, 104, 110, 111 and 145.²³ The PCR analysis was performed according to the protocol described by Koning et al.²³, with some small modifications. The PM-PCR was prepared for the final volume of 12.5ul containing 6.25ul GoTaq Green Master Mix (Promega), 1ul of eluted DNA (up to 100ng), 10 pmoles PM-A (5'-ACTGACCAAAGCTGGAAATC-3') and 10 pmoles PM-D primer (5'-TCTTGCAGAGCATTGAAACG-3'). The PCR reaction was performed on a MyCycler™ thermal cycler (BioRad), under the following cycling: 95°C for 1 min, followed by 35 cycles of 95°C for 30s, 52°C for 45s, and 72°C for 45s; followed by a final extension at 72°C for 5 minutes. The generated fragment of 117bp relative to the amplification of an E1 gene region of HPV was observed in 1% agarose prepared in TB buffer and visualized by the presence of ethidium bromide (10µg/ml).

The FAP-PCR was performed using HPV specific primers from the beta-papillomavirus group, and was able to identify HPV3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15,

16, 17, 18, 20, 21, 22, 23, 24, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 36, 37, 38, 39, 42, 43, 45, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 57, 59, 60, 61, 62, 64, 65, 67, 68, 69, 70, 72, 73, 75, 76, 77 and 80.²⁰ The PCR analysis was performed according to the protocol described by Koning et al.²⁴, with some small modifications. The FAP-PCR was prepared for the final volume of 12.5ul containing 6.25ul GoTaq Green Master Mix (Promega), 1ul of the eluted DNA (up to 100ng), 10 pmoles FAP59 (5'-TAACWGTIGGICAYCCWTATT-3') and 10 pmoles FAP64 (5'-CCWATATCWWHCATITCICCATC-3'). The PCR was performed using Veriti™ Thermal Cycler (Applied Biosystems™), with the following parameters: 5 min at 95°C; 45 cycles of 60s at 95°C, 60s at 50 °C and 60s at 72 °C, followed by a final extension for 5 min at 72 °C. The generated fragment of 478bpb relative to the amplification of a region of the HPV E1 gene was observed in 1% agarose prepared in TB buffer and visualized by the presence of ethidium bromide (10 µg/ml).

Data analysis

The crude and adjusted odds ratio, a 95% confidence interval and the p-value were calculated for the association of socio-demographic variables, a history of skin cancer, chemical and photo exposures, Fitzpatrick skin type classifications, UVBs, β-HPV, and SCC on exposed skin areas in adults and older people. The chi-square and Fisher tests were applied. The Student's t-test was applied for the age and BMI variables. Variables were considered associated with a p-value <0.05. A multiple logistic regression analysis model was tested using UVBs, β-HPV and other confounding variables as possible predictors of SCC. Variables that presented a p-value of <0.20 in the univariate analysis were selected for the multivariate analysis, after which the variables that presented a value of p <0.05 remained in the final model. The step-up strategy was used, where the variables were introduced sequentially into the model, according to the value of p. The UVBs, β-HPV and SCC associations were adjusted by the set of variables selected and by the final multivariate.

RESULTS

With the use of dermatoscopic and histopathologic criteria²² for SCC in situ or intraepithelial (Tis), 45.2% of the SCC sample was classified as Stage I, and 19.4% as microinvasive stage II (T1N0), and SCC was not characterized in 35.5%. It was accordingly observed that 64.6% of SCC cases were diagnosed in early Stages I and II (TNM-AJCC).

Characterizing the profile of the cases, 51.7% reported a history of NMSC; 93.4% presented with actinic keratosis (AK) lesions and 43.9% presented with ten or more AKs.

Among the patients with SCC, the frequency of UVBs was 69.8%, whereas in the controls the frequency was 24% (OR 7.33 95% CI 3.45-15.6).

The frequency of β -HPV in the SCC group was 23.4%, whereas in the controls it was 1.8% (OR 17.1 CI 2.12 - 138), when we compared the cases lesions and the back of the hand. However, we considered any site of the skin in the cases and compared them with back of the hands of the controls and the frequency was 36.2% in the cases and 1.8% in the controls (OR 31.4 CI 4.02 - 250).

In the group of exposures to UVBR, Fitzpatrick skin type classifications I and II were observed, represented in 85.7% of those with SCC, while in the controls it was 25.3% (OR 17.7 CI 95% 7.36 - 42.5).

Photo-exposure in an open environment for 4 or more hours, during 10 or more years was observed in 71% of those with SCC and in 30.6% of the controls (OR 5.07 95% CI 2.31-11.1). Additionally, within the UVBR exposure group in an open environment, 41.3% presented with SCC and worked in agriculture, while in the controls this percentage was 14.75% (OR 4.09 95% CI 1.81 - 9.22).

In the group of exposure to chemicals, the chances of being a current or former smoker occurred in 57.1% of the SCC cases and in 38.7% of the controls (OR 2.1 95% CI 1.07 - 4.18). The smoking load of over 35 pack/years occurred in 58.1% of the cases and 38.7% of the controls (OR 2.11 CI 1.07 - 4.18).

A MED ≥ 18 KJ/cm² was observed in 50% of the SCC cases and in 72% of the controls (OR 0.39 CI 95% 0.18 – 8.84).

A total of 58.1% of those with SCC were male and 26.4% in the controls (OR 3.68 and CI 95% 1.87 – 8).

The age range of those with SCC was 67.3 ± 13.1 and 49.1 ± 14.8 in the controls (OR 1.10 95% CI 1.06 - 1.12). The 60-year-old age group was observed in 73.1% of SCC cases and in 24% of the controls (OR 6.33 95% CI 3.01 - 13.3).

A total of 68.3% of the SCC cases had attended school ≤ 8 years and 50.7% of the controls (OR 2.09 CI 95% 1.04 - 4.20).

The variables with a p-value <0.20 were selected for multiple logistic regression and the variables that presented a p-value <0.05 remained in the final model, thus characterizing a risk profile of SCC, UVBs (OR 3.69 CI 1, 01-13.5); at least one β -HPV subtype 9.38 (0.46 - 189.5), a Fitzpatrick skin type classification of I and II (OR 40.2 IC 9.34 - 172.9); sunburn after 20 years of age (OR 7.95 CI 1.34 - 47.1); aged 60 years or over (OR 1.11 CI 1.05 - 1.17) and male (OR 9.35 CI 2.26 - 38.8).

DISCUSSION

The following factors were associated with SCC in the studied sample: UVBs, positivity of at least one subtype of β -HPV, Fitzpatrick skin type classifications I and II, burns from UVBR before 20 years of age, a mean age of 60 years and male.

In our results, in UVBs, we observed an odds ratio of 7.1 for SCC, in comparison to the controls. In these individuals, therefore, previous exposure to UVBR, to twice the MED, prevented contact hypersensitivity to DPCP by immunosuppression, thus characterizing UVBs. For decades, the differences have been described regarding the cutaneous test reactivity of individuals who had previously been exposed to small doses of UVB. One of the characteristics is cutaneous immunological tolerance to and the non-recognition of new antigens, classifying 30-40% of individuals without SCC in UVBs and 60% of individuals without SCC in UVBR.¹² Our results demonstrate that 68.9% of individuals with SCC were UVBs, differing from the literature, where UVBs is observed in more than 90% of SCC cases from photo-exposure.¹² There are some possible explanations for the 69.8% proportion of UVBs in patients with SCC in our study, and this difference may be attributed to the size of the sample studied. Another possible explanation could be the dose of the narrowband ultraviolet B radiation (NB-UVB). Therefore, in order to observe this lower proportion of UVBs than that expected in SCC, we investigated the dose used and observed that the median dose ≥ 18 mJ/cm² was encountered in 72% of the controls, and, to a lesser extent, 50% of the patients with SCC. Therefore, the control patients received the highest dose by more than 70%, and even then, the UVRB was 76%. We thus conclude that there was probably no implication of the UVRB dose used. We hypothesized that the non-use of the maximum spectrum of UVRB may have had repercussions on non-immunosuppression. Given that the dose-response curve presents a maximum action in the spectrum of between 260 and 270 nm, followed by 280-290 nm, and then declines steadily to a maximum level of 320 nm, still at the length of a UVRB wave²⁵, for irradiation we used the spectrum between 311 and 312 nm (Narrowband-UVB). We attempted, however, to minimize this effect by determining the maximum and minimum dose, which was between 4.5 - 18 Kj/m². Therefore, since an implication of the NB-UVB spectrum is unlikely, there was a repercussion in the lowest proportion of UVBs in the SCC patients of the sample studied. With regard to the dose of UVBR required for oncogenesis, it has been reported by Noonan et al.,²⁵ that there are differences in the required dose, which is 13 times greater than that required to induce CH in 50% of irradiated animals.

Our results demonstrated positivity for β -HPV in SCC patients with an odds ratio of 9.38 in patients with positive β -HPV, when compared to controls. These findings differ from the findings of Asgari et al.²⁶ who encountered no difference in SCC patients compared to healthy controls. In the present study, it was also observed that, when we consider the presence of β -HPV in all sites of photo-exposed skin, the odds ratio for SCC increases to 42.8. Therefore, it is possible to accept that there is an association between β -HPV and photo-exposed skin and SCC on photo-exposed skin, contrary to the findings of Asgari et al.²⁶, Koning et al.²⁷ and Harwood et al.²⁸, who observed no differences in the prevalence of HPV on UVR-exposed or -unexposed skin. Our results, however, are in agreement with the findings of Forslund et al.¹⁹ who reported an association of β -HPV with SCC on photo-exposed skin and also with the areas of photo-exposed skin with no lesions. In the present study, we only selected patients with the SCC-type of NMSC and for the control group, any individual with lesions or dermatoses suggestive of association with HPV, such as papillomatous, verrucous or squamo-keratotic lesions, such as black papular dermatosis, keratoses and seborrheic warts. Thus, the possibility of selection bias was reduced by including individuals with dermatoses possibly associated with β -HPV in the control group. In our control group, the observed β -HPV frequency was 1.8%.

In our sample, PCR was used to identify β -HPV in SCC in situ in 45.2% of the studied sample, and positivity for β -HPV was found in 36.2%. It is therefore suggested that β -HPV may be associated with SCC at induction, although it is not possible to state whether it is in the maintenance of SCC, since our tests (PCRs) were applied to SCC samples during the initial stages, in situ or microinvasive. In the literature, it has not been defined as to whether β -HPV is associated with SCC on photo-exposed skin and whether participation takes place during induction or maintenance or in both phases of SCC development. For some authors, the participation of β -HPV in SCC on the skin occurs during induction, but not maintenance.^{29,30} In a recent study, with the immune-histochemical analysis of 3,846 specimens from biopsies diagnosed with SCC in situ, it was observed that all tumors with a multicentric characteristic presented HPV positivity.³¹

Our results demonstrated the presence of actinic keratosis (AK) lesions in approximately 93% of patients with SCC, with more than 10 AKs in 43.9% of cases. In the literature, an association between β -HPV and the presence of more than 10 AK lesions has been reported.³² In another study, persistent β -HPV infection associated with the presence of AK lesions on the face was observed.³³ There are also reports of an association between β -HPV and AKs, pointing to the participation of β -HPV in the induction of SCC.³³

The present study suggests that HPV positivity may be associated with photo-exposed skin and SCC on photo-exposed skin. The incidence of SCC has been increasing worldwide, mainly resulting from determinants of environmental exposure, especially exposure to UVRB, which remains the main risk factor for SCC in Caucasians. The absence of β -HPV on exposed skin of control patients indicates the possibility of protection from the UVRB phenotype, present in 76% in the controls and only 30.2% of the patients with SCC. It is therefore suggested that the non-predisposition to the infection of photo-exposed skin by β -HPV may be explained by UVRB in this group of individuals. To confirm our results, it is necessary to carry out further studies to assess both exposed and unexposed skin to UVRB and to investigate the presence of viral activity apart from HPV DNA.

Our results have demonstrated that skin types I and II were associated with SCC. Skin types I and II are characterized by skin color and light-colored eyes, are more prone to burning and either tan slightly or not at all and in accordance with the literature studied, are associated with SCC.³⁴

In our study, working in agriculture was associated with SCC in the univariate analysis. However, this association was lost after adjustment for other factors, in the multivariate analysis, and did not remain in the final model. In another study, it was observed that occupational categories with a high socioeconomic status not involving exposure to the sun, and certain other occupations with potent exposure to chemical substances, as well as occupational categories in open environments exposed to UVRB, presented a higher risk of SCC compared to the general population.⁹ In our study, we investigated exposure to UVRB in certain occupations, and examined some chemical exposures, such as arsenic and other chemicals applied in agricultural practice, and we encountered no association.

We observed an association between burns before the age of 20 and the occurrence of SCC, thus corroborating the findings of S Wu et al.⁸ Ziegler et al.³⁵ reported that mutation in the p53 tumor suppressor gene encountered in more than 90% of SCC cases is also observed in AK, and that sunburn can select clonal expansion cells with mutated p53 within AK, and may act doubly as primers and as promoters of the tumor. It was observed that burns on the torso are associated with SCC in men (OR 1.48 CI 1.08 - 2.03).³⁶

With respect to age, we observed an association between the group aged 60 years and over and SCC. Our results are in accordance with the studied literature, which demonstrates a higher incidence of SCC from the age of 40, with higher indices from 60 years.^{8,10,38} However, there is a risk of increased SCC in earlier ages (15 to 30 years) depending on the geographical area of high or medium incidences of UVRB.³⁸

In the present study, we observed a higher occurrence of SCC in males. As possible explanatory factors, Chen et al.,³⁹ observed differences in the form of sun exposure between the sexes, observing that exposure during the whole life is more related to the risk of SCC in women, whereas, initiating early exposure seems to be more relevant for the risk of SCC in males. In our study we encountered no difference in behavior between the sexes, and we would suggest further exploration in this area. For Rudolph et al.,⁵ there has been an increase in the incidence of skin cancer in both sexes worldwide, however, this is predominately in females. Welsh et al.,⁴⁰ reported that this growth trend predominantly in females may be explained by genetic risk determinants of different NMSCs by gender, in UBRV-induced immune suppression, with IL10 functional variants associated with increased odds ratios of NMSC, which occur largely in females.

CONCLUSION

The presence of β -HPV on exposed skin is a risk factor for SCC in the population of patients treated at the skin cancer outpatient clinic at the Hospital de Câncer de PE - Brazil.

The risk factors indicated by the research for SCC in our population were: UVBs, presence of β -HPV, older people, light-colored skin, hair and eyes, and being male.

In Brazil, which is a tropical country with medium to high UVRB rates, there has been an increased incidence of SCC and further research is needed in order to verify factors associated with the infection and persistence of β -HPV in SCC on photo-exposed skin, such as immune deficiency due to susceptibility to UVRB in our population, and β -HPV, which was the object of our study

We recommend that patients with more than 10 AKs should be observed in referral services and skin cancer outpatient clinics in order to search for suspected SCC lesions with dermatoscopy and histopathology.

Conflict of interest statement

The authors hereby declare they have no conflict of interest.

Acknowledgements

We would like to express our sincerest thanks to the patients and families who have contributed by believing in new scientific knowledge related to skin cancer, and in improving the health of people and their quality of life.

REFERENCES

- 1 Armstrong BK, Krickler A. The epidemiology of UV induced skin cancer. *J Photochem Photobiol B*. 2001;63(1-3):8-18.
- 2 Leiter U, Eigentler T, Garbe C. Epidemiology of skin cancer. *Adv Exp Med Biol*. 2014; 810:120-140.
- 3 Rigel DS. Cutaneous Ultraviolet Exposure and Its Relationship to the Development of Skin Cancer. *J Am Acad Dermatol*. 2008; 58(5 Suppl 2):S129-132. doi: 10.1016/j.jaad.2007.04.034
- 4 INCA. Pele não melanoma. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pele_nao_melanoma>. Acesso em: 24 mar. 2016.
- 5 Rudolph C, Schnoor M, Eisemann N, et al. Incidence trends of nonmelanoma skin cancer in Germany from 1998 to 2010. *J Dtsch Dermatol Ges*. 2015;13(8):788-797. doi: 10.1111/ddg.12690.
- 6 Rebel HG, Bodmann CA., van de Glind GC, et al. UV-induced ablation of the epidermal basal layer including p53-mutant clones resets UV carcinogenesis showing squamous cell carcinomas to originate from interfollicular epidermis. *Carcinogenesis*. 2012; 33(3):714-720. doi: 10.1093/carcin/bgs004.
- 7 Thompson EA, Zhu S, Hall JR, et al. C/EBP α expression is downregulated in human nonmelanoma skin cancers and inactivation of C/EBP α confers susceptibility to UVB-induced skin squamous cell carcinomas. *J Invest Dermatol*.; 131(6):1339-1346. doi: 10.1038/jid.2011.31.
- 8 WU S, Han J, Vleugels RA, et al. Cumulative ultraviolet radiation flux in adulthood and risk of incident skin cancers in women. *Br J Cancer*. 2014; 110:1855–1861. doi:10.1038/bjc.2014.43
- 9 Alfonso JH, Martinsen JI, Pukkala E, et al. Occupation and relative risk cutaneous skin carcinoma (cSCC): A 45-year follow-up study in 4 Nordic countries. *J Am Acad Dermatol* 2016; 75(3):548-555.
- 10 Schmieder GJ, Yoshikawa T, Mata SM, et al. Cumulative sunlight exposure and the risk of developing skin cancer in Florida. *J Dermatol Surg Oncol*. 1992; 18(6):517-522.

- 11 Kurimoto I, Streilein JW. Characterization of the immunogenetic basis of ultraviolet-B light effects on contact hypersensitivity induction. *Immunology*. 1994; 81(3):352-358.
- 12 Yoshikawa T, Era V, Bruins-Slot W., et al. Susceptibility to Effects of UVB Radiation on Induction of Contact Hypersensitivity as a Risk Factor for Skin Cancer in Humans. *The Journal of Investigative Dermatology. J Invest Dermatol*. 1990; 95(5):530-536.
- 13 Taylor JR, Schmieder GJ, Shimizu T, et al. Interrelationship between ultraviolet light and recurrent herpes simplex infections in man. *J Dermatol Sci*. 1994; 8(3):224-232.
- 14 Vermeer M, Streilein JW. Ultraviolet B lighth-induced alterations in epidermal Langerhans cells are mediated in part by tumor necrosis factor-alpha. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 1990; 7(6):258-265.
- 15 Yoshikawa T, Kurimoto I, Streilein JW. Tumour necrosis factor-alpha mediates ultraviolet light B-enhanced expression of contact hypersensitivity. *Immunology*. 1992; 76(2): 264–271.
- 16 Rodrigues MM, Ximenes RAA, Dantas MMS, et al. A UVB-Suscetibilidade como fator de risco para o desenvolvimento da hanseníase virchowiana. *An Bras Dermatol*. 2010; 85(6):835-842.
- 17 Barzilai A, Lyakhovitsky A, Trau H, et al. Expression of p53 in the evolution of squamous cell carcinoma: correlation with the histology of the lesion. *J Am Acad Dermatol*. 2007; 57(4):669-676.
- 18 Marinescu, A, Stepan AE, Margaritescu C, et al. P53, p16 and immunossupression in cutaneous squamous cell carcinoma and its precursos lesions. *Rom J Morphol Embriol*. 2016; 57(2 Suppl):691-696.
- 19 Forslund O, Iftner T, Andersson K. Cutaneous Human Papillomaviruses Found in Sun-Exposed Skin: Beta-papillomavirus Species 2 Predominates in Squamous Cell Carcinoma. *J Infect Dis*. 2007; 196(6): 876–883. doi:10.1086/521031.
- 20 Harwood CA, Suretheran T, Sasieni P, et al. Increased risk of skin cancer associated with the presence of epidermodysplasia verruciformis human papillomavirus types in normal skin. *Br J Dermatol*. 2004; 150(5):949-957.
- 21 Correa RM, Vladimirsky S, Heideman DA et al. Cutaneous human papillomavirus genotypes in different kinds of skin lesions in Argentina. *J Med Virol*. 2017; 89(2):352-357. doi: 10.1002/jmv.24631.

- 22 Zalaudek I, Gilacomel J, Schmid K, et al. Dermatoscopy of facial actinic keratosis, intraepidermal carcinoma, and invasive squamous cell carcinoma: A progression model. *J Am Acad Dermatol*. 2012; 66(4):589-597. doi: 10.1016/j.jaad.2011.02.011.
- 23 Koning M, Quint W., Struijk L, et al. Evaluation of a Novel Highly Sensitive, Broad-Spectrum PCR-Reverse Hybridization Assay for Detection and Identification of Beta-Papillomavirus DNA. *J Clin Microbiol*. 2006; 44(5): 1792–1800. doi:10.1128/JCM.44.5.1792–1800.2006
- 24 Koning M, Forslund O, Bacevskij, et al. Bead-Based Multiplex Genotyping of 58 Cutaneous Human Papillomavirus Types. *J Clin Microbiol*. 2011 Oct; 49(10): 3560–3567. doi: 10.1128/JCM.01173-11
- 25 Noonan FP, De Fabo EC, Kripke ML. Suppression of contact hypersensitivity by UV radiation and its relationship to UV-induced suppression of tumor immunity. *Photochem Photobiol*. 1981; 34(6):683-689
- 26 Asgari MM, Kiviat NB, Critchlow CW, et al. Detection of human papillomavirus DNA in cutaneous squamous cell carcinoma among immunocompetent individuals. *J Invest Dermatol*. 2008; 128(6):1409-1417. doi: 10.1038/sj.jid.5701227.
- 27 De Koning, Weissenborn SJ, Abeni D, et al. Prevalence and associated factors of betapapillomavirus infections in individuals without cutaneous squamous cell carcinoma. *J Gen Virol*. 2009; 90(Pt 7):1611-21. doi: 10.1099/vir.0.010017-0.
- 28 Harwood CA, Suretheran T, Sasieni P, et al. Increased risk of skin cancer associated with the presence of epidermodysplasia verruciformis human papillomavirus types in normal skin. *Br J Dermatol*. 2004;150(5):949-957
- 29 Aldabagh B, Angeles JGC, Cardones AR, et al. Cutaneous Squamous Cell Carcinoma and Human Papillomavirus: Is There Na Association? *Dermatol Surg*. 2013; 39(1 Pt 1):1-23. Doi: 10.1111/j.1524-4725.2012.02558.x
- 30 Schiller JT, Buck CB. Cutaneous squamous cell carcinoma: a smoking gun but still no suspects. *J Invest Dermatol*. 2011; 131(8):1595-1596. Doi: 10.1038/jid.2011.151.
- 31 Gross JA, Perniciaro C. Histopathologic Variants of Cutaneous Squamous Cell Carcinoma In Situ With Analysis of Multicentric Subtypes: Possible Relationship to Human Papillomavirus. *Am J Dermatopathol*. 2015; 37(9):680-685. Doi: 10.1097/DAD.0000000000000354

- 32 McBride P, Neale R, Pandeya N, et al. Sun-related factors, betapapillomavirus, and actinic keratoses: a prospective study. *Arch Dermatol.* 2007; 143(7):862-868.
- 33 Plasmeyjer EI1, Neale RE, de Koning MN, et al. Persistence of betapapillomavirus infections as a risk factor for actinic keratoses, precursor to cutaneous squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 2009; 69(23):8926-31. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-1186
- 34 MacKie RM. Long-term health risk to the skin of ultra-violet radiation. *Prog Biophys Mol Biol.* 2006; *Prog Biophys Mol Biol.* 2006; 92(1):92-96.
- 35 Ziegler A1, Jonason AS, Leffell DJ, et al. Sunburn and p53 in the onset of skin cancer. *Nature.* 1994; 372(6508):773-776.
- 36 Wu S, Cho E, Li WQ, et al. History of Severe Sunburn and Risk of Skin Cancer Among Women and Men in 2 Prospective Cohort Studies. *Am J Epidemiol.* 2016; 183(9):824-833. Doi: 10.1093/aje/kwv282.
- 37 Videnović G, Miljuš D, Ilić D, et al. Nonmelanoma Skin Cancer in the Population of the City of Belgrade in the Period 1999-2011. *Srp Arh Celok Lek.* 2015; 143(5-6):290-295.
- 38 Wei-Passanese EX, Han J, Lin W, et al. Geographical variation in residence and risk of multiple nonmelanoma skin cancers in US women and men. *Photochem Photobiol.* 2012; 88(2):483-489. Doi: 10.1111/j.1751-1097.2012.01077.x.
- 39 Chen Y-C, Christiani DC, Jenny Su HJ. Early-life or lifetime sun exposure, sun reaction, and the risk of squamous cell carcinoma in an Asian population. *Cancer Causes Control.* 2010; 21(5):771-6. Doi: 10.1007/s10552-010-9505-x.
- 40 Welsh MM, Karagas MR, Kuriger JK, et al. Genetic Determinants of UV-Susceptibility in Non-Melanoma Skin Cancer. *PLoS One.* 2011; 6(7):e20019. Doi: 10.1371/journal.pone.0020019.

SOCIODEMOGRAPHIC CHARACTERISTICS		
	Definition	Category
Age	Age on day of interview according to date of birth.	< 60 years 60 years and over
Sex	Relating to male/female.	Male. Female
VARIABLES RELATED TO PHOTO-EXPOSURE		
Fitzpatrick skin type classification		
Very sensitive	Always burns, never tans	I – White-Red hair
Sensitive	Burns easily, tans minimally	II - White
Normal	Sometimes burns, slowly tans	III – Slightly darker skin
Normal	Burns minimally, tans easily	IV – Moderate brown
Minimally sensitive	Rarely burns, tans well	V – Dark brown
Insensitive	Never burns, deep pigmented	VI - Black
Level of sun exposure according to anatomical site (professional)		
Intense exposure	Head, neck and backs of hands.	Category I
Moderate exposure	Torso and limbs	Category II
Susceptibility to ultraviolet B radiation	These are individuals who, when exposed to small doses of UVBR twice the minimum erythematous dose (MED), before the application of the hapten diphenhydramine, do not develop contact dermatitis, which would be expected after the second exposure, and which occurs in those who are UVB-resistant (UVBR).	UVBs
Resistance to ultraviolet B radiation	These are individuals who, when exposed to small doses of UVBR twice the minimal erythematous dose (MED), before the application of hapten diphenhydramine, develop contact dermatitis which would be expected after the second exposure,	UVBR

and that does not occur in those who are UVB susceptible (UVBs).		
Exposure classification	Definition	Category
β-HPV		
β-HPV	The presence is identified of at least one subtype of β-HPV DNA through polymerase chain reaction (PCR)	Yes
		No

Figure 1- Socio-demographic characterizations referring to the photo-exposure of the patients in the sample.

Figure 2 – Response to the contact test with DPCP for characterizing individuals in UVBs and UVBR

(-)	Negative reaction;
(+)	Weak reaction = discrete erythema, little infiltration, no blistering;
(++)	Strong reaction = moderate erythema, occasional papules, few vesicles;
(+++)	Very strong reaction = strong edema and many vesicles;
(++++)	Extreme reaction = formation of blisters and ulceration..

Legends: -Negative = non-reactors: considered UVB-susceptible (UVBs);
 -Positive = reactors: UVB-resistant (UVBR).

Table 1 - Characteristics of patients with SCC on photo-exposed skin in adults and older people

Characteristics	Number (%)
History of skin câncer	
Yes	31 (51.7%)
No	29 (48.3%)
Actinic keratosis	
No	4 (6.6%)
Yes	57 (93.4%)
<10	32 (56.1%)
≥ 10	25 (43.9%)
BCC	
Yes	16 (26.2%)
No	45 (73.8%)
SCC site	
Category 1	33 (54.1%)
Category 2	28 (45.9%)
Staging	
In situ	28 (45.2%)
Microinvasive	12 (19.4%)
No information on HP	22 (35.5%)

Table 2 – Socio-demographic characteristics, background to NMSC, UVBs, β -HPV associated with SCC on photo-exposed skin in adults and older people

(to continue)

Variables	SCC		OR (CI (95%))	p-value
	Yes	No		
	(n = 63)	(n = 75)		
UVB				
Resistant	19 (30.2%)	57 (76.0%)	1.0	
Susceptible	44 (69.8%)	18 (24.0%)	7.33 (3.45 – 15.6)	<0.001
HPVs (any site)				
Absence	30 (63.8%)	56 (98.2%)	1.0	
Presence	17 (36.2%)	1 (1.8%)	31.7 (4.02 – 250.2)	0.001
β-HPV (only on the lesion)				
Absence	36 (76.6%)	56 (98.2%)	1.0	
Presence	11 (23.4%)	1 (1.8%)	17.1 (2.12 – 138.3)	0.008
Socio-demographic variables				
Sex				
Female	26 (41.9%)	53 (73.6%)	1.0	
Male	36 (58.1%)	19 (26.4%)	3.86 (1.87 – 8.00)	<0.001
Age	67.3 ± 13.1	49.1 ± 14.8	1.10 (1.06 – 1.12)	<0.001
Age Group				
Under 60 years	21 (26.9%)	57 (76.0%)	1.0	
60 years or over	42 (73.1%)	18 (24.0%)	6.33 (3.01 – 13.3)	<0.001
Schooling (in years)				
> 8 years	20 (31.7%)	37 (49.3%)	1.0	
≤ 8 years	43 (68.3%)	38 (50.7%)	2.09 (1.04 – 4.20)	0.038
Family income				
More than 3 MS*	10 (16.4%)	9 (12.0%)	1.0	
Between 1and 3 MS*	36 (59.0%)	42 (56.0%)	0.77 (0.28 – 2.10)	0.613
Up to 1 MS*	15 (24.6%)	24 (32.0%)	0.56 (0.19 – 1.70)	0.309

*Minimum Salary

Table 2 – Socio-demographic characteristics, background to NMSC, UVBs, β -HPV associated with SCC on photo-exposed skin in adults and older people

(continuation)

Variable	SCC		OR (CI (95%))	p-value
Background to skin cancer				
Family history of skin cancer				
No	48 (76.2%)	62 (82.7%)	1.0	0.348
Yes	15 (23.8%)	13 (17.3%)	1.49 (0.65 – 3.43)	
Chemical exposure				
Smoker				
Never smoked	26 (41.9%)	46 (61.3%)	1.0	0.031
Current or former smoker	36 (58.1%)	29 (38.7%)	2.11 (1.07 – 4.18)	
Smoking load (years/pack)				
Never smoked	26 (44.8%)	46 (61.3%)	1.0	0.102
Less than 35	26 (44.8%)	25 (33.3%)	1.84 (0.87 – 3.81)	
35 and overs	6 (10.4%)	4 (5.4%)	2.65 (0.69 – 10.3)	
Exposure to arsenic				
No	59 (93.7%)	74 (98.7%)	1.0	0.154
Yes	4 (6.3%)	1 (1.3%)	5.02 (0.55 – 46.1)	
Occupation ^a				
Other occupations	37 (58.7%)	64 (85.3%)	1.0	0.001
Agriculture	26 (41.3%)	11 (14.7%)	4.09 (1.81 – 9.22)	

Table 2 – Socio-demographic characteristics, background to NMSC, UVBs, β -HPV associated with SCC on photo-exposed skin in adults and older people

Variables	SCC		OR (CI(95%))	p-value	(conclusion)
	Yes (n = 63)	No (n = 75)			
Photo exposure					
Photo-damage					
None or Mild	37 (58.7%)	33 (44.6%)	1.0		
Moderate or Severe	26 (41.3%)	41 (55.4%)	0.57 (0.29 – 1.11)	0.100	
Fitzpatrick skin type classification					
III to VI	9 (14.3%)	56 (74.7%)	1.0		
I and II	54 (85.7%)	19 (25.3%)	17.7 (7.36 – 42.5)	<0.001	
Previous burns					
No	40 (63.5%)	57 (76.0%)	1.0		
Yes	23 (36.5%)	18 (24.0%)	1.82 (0.87 – 3.81)	0.111	
Burns before the age of 20 years					
No burns	41 (65.1%)	61 (81.3%)	1.0		
After the age of 20 years	8 (12.7%)	4 (5.3%)	1.77 (0.72 – 4.33)	0.210	
Before the age of 20 years	14 (22.2%)	10 (13.3%)	2.85 (0.83 – 9.79)	0.097	
Photo-exposure in the environment					
Closed environment	15 (24.2%)	38 (52.8%)	1.0		
Open environment for less than 10 years for at least 4hr/day	3 (4.8%)	12 (16.7%)	0.63 (0.16 – 2.57)	0.522	
Open environment for 10 years or more and 4hr or more per day	44 (71.0%)	22 (30.6%)	5.07 (2.31 – 11.1)	<0.001	
Minimal erythematous dose					
Mean ± sd	18.1 ± 8.9	20.1 ± 8.3	0.97 (0.93 – 1.02)	0.218	
Categorized ^a					
< 18	23 (50.0%)	21 (28.0%)	1.0		
≥ 18	23 (50.0%)	54 (72.0%)	0.39 (0.18 – 0.84)	0.016	
Region					
Metropolitan	42 (66.7%)	52 (69.3%)	1.0		
Zona da Mata (Coastal Forest)	7 (11.1%)	9 (12.0%)	0.96 (0.33 – 2.80)	0.945	
Agreste (Hot/sub-humid)	11 (17.5%)	11 (14.7%)	1.23 (0.49 – 3.14)	0.652	
Backlands	3 (4.8%)	3 (4.0%)	1.23 (0.23 – 6.45)	0.800	
BMI					
Normal	24 (38.1%)	30 (40.0%)	1.0		
Overweight	30 (47.6%)	29 (38.7%)	1.29 (0.62 – 2.71)	0.496	
Obese	9 (14.3%)	16 (21.3%)	0.70 (0.26 – 1.87)	0.480	

Table 3 – Multivariate model – Logistic regression – Risk factors for SCC on photo-exposed skin of adults and older people

Variables	OR (CI(95%))	p-value
UVBs		
Resistant	1.0	
Susceptible	7.12 (1.46 – 34.6)	0.015
β-HPV (any site)		
Absence	1.0	
Presence	42.8 (2.34 – 780.6)	0.011
No information	2.47 (0.48 – 12.8)	0.280
Sex		
Female	1.0	
Male	6.49 (1.27 – 33.2)	0.025
Age	1.13 (1.06 – 1.20)	<0.001
Fitzpatrick skin type classification		
III to VI	1.0	
I and II	99.9 (13.9 – 714.7)	<0.001
Burns before the age of 20		
No burns	1.0	-
Before the age of 20	69.1 (5.76 – 829.2)	0.001
After the age of 20	2.45 (0.29 – 21.0)	0.414

Table 4 – Multivariate model – Logistic regression – Risk factors for SCC on photo-exposed skin- β -HPV only on the lesion – of adults and older people

Variables	OR (CI(95%))	p-value
UVB		
Resistant	1.0	
Susceptible	6.11 (1.33 – 28.1)	0.020
β-HPV (only on the lesion)		
Absence	1.0	
Presence	9.38 (0.46 – 189.5)	0.0144
No information	1.94 (0.40 – 9.46)	0.414
Sex		
Female	1.0	
Male	9.29 (1.89 – 45.5)	0.006
Age		
	1.13 (1.06 – 1.20)	<0.001
Fitzpatrick skin type classification		
III to VI	1.0	
I and II	73.7 (12.3 – 441.1)	<0.001
Burns before the age of 20		
No burns	1.0	-
Before the age of 20	56.5 (5.10 – 625)	0.001
After the age of 20	2.21 (0.26 – 18.4)	0.464

ARTICLE 2

UVBS AND TOLL-LIKE RECEPTOR 9 EXPRESSION IN SQUAMOUS CELL CARCINOMA ON PHOTO-EXPOSED SKIN IN ADULTS AND OLDER PEOPLE

Authors:

Mecciene Mendes Rodrigues^{1,2,3,6}

Kleber Jatahy³

Leuridan Cavalcante Torres³

Ricardo Arraes de Alencar Ximenes^{1,4}

¹Postgraduate Program in Tropical Medicine, Center for Health Sciences (CCS), Federal University of Pernambuco (UFPE), Recife, Pernambuco, Brazil

²Cancer Hospital of Pernambuco - Sociedade Pernambucana de Combate ao Câncer, (HCP), Recife, Brazil.

³Agreste Academic Center - Nucleus of Life Sciences - Universidade Federal de Pernambuco – Caruaru - Brazil

⁴Translational Research Laboratory Prof. C. A. Hart, Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP) Recife, Brazil.

⁵ State University of Pernambuco, Recife, Brazil – Universidade de Pernambuco, Recife, Pernambuco – Brazil

⁶ Professor of the postgraduate course in integral health – Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira – IMIP.

Corresponding author:

Mecciene Mendes Rodrigues

Agreste Academic Center - Nucleus of Life Sciences - Universidade Federal de Pernambuco – Caruaru - Brazil

Rodovia BR-104, Km 59, s/n - Nova Caruaru, Caruaru - PE, 55002-970

Telefone: + 55 81 99167-9416

E-mail: mecciene@gmail.com

ABSTRACT

Non-melanoma skin cancers (NMSC) occur most commonly in Caucasians and squamous cell carcinoma (SCC) accounts for 20% of NMSCs. Exposure to ultraviolet B radiation (UVBR) is the major risk factor for SCC in photo-exposed skin, and 90% of individuals with SCC are UVB-susceptible (UVBs). Toll-like receptors 9 (TLR9) are cytoplasmic cell surface receptors and are expressed in cells of the immune system and keratinocytes. They are components of the innate immune system, and have been studied in SCC in the head and neck and cervix and lungs. In the present study we assessed the TLR9 in SCC in the photo-exposed skin of adults and older people. This study evaluated 19 patients with SCC on photo-exposed skin of adults and older people, and 16 controls. Of the SCC cases, 80% presented with UVBs ($p<0.05$); 94.7% of the cases were Fitzpatrick skin types I and II ($p<0.000$); 73.4% were male ($p<0.012$) with a mean age of 70 years $\pm$ 13 ($p<0.000$). We observed that the mean fluorescence intensity (MFI) of the TLR9 expression in the total lymphocytes was lower in patients with SCC when compared to the control group ($p<0.04$). The MFI TLR9 expression in the total leukocytes, total lymphocytes and B cells was lower in UVBs patients when compared to the UVBR patients ($p<0.01$, 0.004 and 0.01, respectively). These findings suggest suppression of the innate and adaptive immune systems through deficient TLR9 expression in UVBs individuals and in SCC cases, and that UVBs may also constitute a greater risk of SCC via TLR9. A mean age of 70 years recorded in the SCC patients may also be associated with a deficient TLR9 expression and may also be attributed to ultra-structural changes in senescence skin. The TLR9 expression in peripheral blood by flow cytometry was easy to perform and with low risk. Further research with a larger number of participants is required.

Key words: UVBs; TLR9; SCC; flow cytometry; CD14+, CD20+, and CD16+ lymphocytes; Fitzpatrick skin types.

1. INTRODUCTION

Exposure to ultraviolet B radiation (UVBR) remains the major risk factor for non-melanoma skin cancers (NMSC), and squamous cell carcinoma (SCC) is the second most prevalent within the group, and corresponds to around 20% of all NMSCs in Brazil. [1-2]

Ultraviolet B-susceptibility (UVBs) is a risk marker for NMSC, is from autosomal inheritance and is present in about 90% of the individuals with SCC, as opposed to 40% of the population. [3-5] In UVBs individuals, cells that have suffered DNA damage through UVBR express mutation in the p53 gene, with apoptosis damage and the consequent induction of SCC. [6]

Exposure to UVBR leads to cellular damage and photoproducts may constitute damage-associated molecular patterns (DAMPs). [7] DAMPs are recognized by the toll-like receptors (TLRs), which are components of the innate immune system. [8] Toll-like receptors are cytoplasmic cell surface receptors expressed in the monocytes/macrophages, B lymphocytes, dendritic cells and in epithelial cells. [9] Ten TLRs (TLR1 to TLR10) have already been described, of which the TLR9 is one of the most important in the process of carcinogenesis, and may lead to an increase of cytokines IL-6, IL-12 and TNF α . Cytokines IL-6, IL-12 and TNF α are known to promote carcinogenesis. [10, 11]

The TLR9 expression may therefore promote a deregulation of the immune response and lead to oncogenesis through chronic inflammatory reaction, angiogenesis and immunosuppression. [11-13]

The skin is the largest organ of the human body, it is in contact with the external environment and is one of the components of the innate immune system, since it is the main physical barrier of the body. [14] Due to its external location, the skin is exposed to oxidative stress, inflammation, immunosuppression, DNA cellular damage and genetic mutation, photocarcinogenesis and photoaging caused by exposure to UVBR. [15-16]

The TLR9 expression has been studied in SCCs on sites unexposed to UVBR in oral, head and neck, stomach, lung and cervical SCCs. However, there have been no studies with SCC on skin exposed to UVBR in adults and older people. [17-25]

Although almost 50 years have now elapsed since the immunological changes and carcinogenesis associated with UVBR exposure were discovered, there are still gaps regarding which molecules are involved and how they lead to changes in the innate and adaptive immune systems. [26]

The present study investigated UVBs and the TLR9 expression in SCC on the photo-exposed skin of adults and older people.

2 METHODS

2.1 Patients

Patients were selected while attending the dermatology outpatient clinic of the Hospital de Câncer de Pernambuco (HCP), and were divided into two groups:

Patient Cases: patients with NMSC, type SCC.

Patient Controls: patients without skin cancer, defined by the inclusion and exclusion criteria.

2.2 Inclusion criteria for cases and controls:

- aged 18 years or over

2.3 Exclusion criteria for cases and controls:

- Patients presenting with other papillomatosis or verrucous cancers identified through clinical skin and mucosal examination;
- Patients presenting with diseases with a proven relationship with UVBs such as recurrent herpes simplex, Hanson's disease or pityriasis versicolor, verified during anamnesis and the search in medical records;
- Patients presenting with immunosuppressive diseases, repeated skin or other infections, on corticosteroid therapy or using other immunosuppressants verified during anamnesis, physical examination, search in medical records and conducting laboratory tests.

- Pregnant women: verified with anamnesis and Beta-HCG test;
- Those with a history of previous exposure to diphenylpicrylhydrazyl, a contact hypersensitizer that was used to identify UVBs individuals.

After patients were selected, they were informed about the research and invited to participate. Those who agreed to participate signed the informed consent form (ICF). The project was submitted to the Research Ethics Committee of the Health Sciences Center at the Universidade Federal de Pernambuco (CEP-CCS-UFPE) and approved under CAAE 21971913.7.0000.5208.

2.4 Determining UVBs

Determining the minimal erythema dose (MED)

To determine the MED, exposure to UVBR was performed using a manual source of narrow-band, which emits ultraviolet radiation with a continuous spectrum and peak between 313 and 317nm (A Pro Lumina apparatus) held at a distance of 2.5 cm. Exposure time was expressed as energy per unit area (Kj/m^2). The chosen area of the body surface was the untanned portion of the lower third of the dorsal trunk.

The test area was coated with a photo-opaque film, with six openings of 2cm^2 , which were irradiated for 120 seconds (3 Kj/m^2); 180 seconds (4.5 Kj/m^2); 240 seconds (6 Kj/m^2); 360 seconds (9 Kj/m^2); 480 seconds (12 Kj/m^2); 720 seconds (18 Kj/m^2). The squares were closed progressively at the corresponding times. Patients were instructed to avoid exposure to the sun during the observation period.

The MED was defined as the time required for the formation of a discrete erythema, well-defined and no blisters, after single exposure to UVBR, expressed as an energy per unit area (KJ/m^2). After 16 to 24 hours of exposure, the erythema was read and the MED was identified.

2.5 Contact test on a previously irradiated dorsal region

In an area corresponding to twice the MED, 0.1ml of 0.05% diphenylpicramide (DPCP) was applied, diluted in acetone contained and fixed to the irradiated skin by a hypoallergenic adhesive, which was removed after 24 hours when the irritant effect of the sensitizer was observed.

2.6 Ultraviolet B Radiation Susceptibility Test (UVBs)

After 21 to 28 days of sensitization with 0.05% DPCP, a contact test was performed to verify contact hypersensitivity to DPCP diluted to 0.001%, placed in the non-irradiated area of the back at the shoulder blade level. The reading was performed 48 hours after application, always by the same observer, who waited for at least 30 minutes after the adhesive had been removed. The reading observed the following criteria:

Frame 1: Interpreting the reading of the test with DPCP at 0.0001%

(-)	Negative reaction;
(+)	Weak reaction = discrete erythema, little infiltration, no blistering;
(++)	Strong reaction = moderate erythema, occasional papules, few vesicles
(+++)	Very strong reaction = strong edema and many vesicles;
(++++)	Extreme reaction = formation of blisters and ulceration.

-Negative = no reactors: considered UVB-susceptible (UVBs);

-Positive = reactors: UVB-resistant (UVBR).

2.7 Cutaneous and histopathological biopsy

A 6mm disposable biopsy punch was performed, preceded by skin cleansing with antiseptic solution and a local anesthesia.

Fragments for histological examination were fixed in 10% formaldehyde, buffered for histology, and stained with hematoxylin-eosin (HE).

SCC “in situ”: the presence of atypical keratinocytes occupying part or all of the epidermis, with evidence of nuclear pleomorphism. There is a presence of hyperkeratosis and parakeratosis.

Invasive SCC: the presence of a proliferation of lobules and detached islands of bright eosinophilic keratinocytes containing a nucleus with some degree of pleomorphism and mitoses. The nucleolus may be prominent with the presence of corneal pearls and apoptotic cells. The presence of invasion is represented by disconnected tumor islands at varying levels of the dermis.

2.8 Flow cytometric analysis of the TLR9 expression

A peripheral blood flow cytometry was performed. A flow cytometric analysis of the TLR9 was conducted using BD TM Phosflow reagents (BD Biosciences, USA). Cells were fixed with 100 μ L pre-warmed Cytofix/CytopermTM BD and incubated for 10 minutes at 37°C. Following this, after centrifugation at 250 x g for 8 minutes, the supernatant was discarded and cell surface labeling was performed with the anti-CD14, anti-CD3, anti-CD16, anti-CD20 monoclonal antibodies. After incubation for 20 minutes at room temperature and protected from light, the cells were permeabilized with 750 μ L Perm Buffer III at 4°C and incubated for 30 minutes on ice, protected from light. The cells were then washed with 3ml of PBS, centrifuged at 250xg for 8 minutes and the supernatant was discarded. Two washing steps were performed. Subsequently, intracellular labeling with the anti-TLR9 monoclonal antibody was performed and incubated for 40 minutes protected from light. A further washing step was performed, the supernatant discarded and the cells re-suspended in 300 μ L of stain buffer and the acquisition was performed on the flow cytometer. After the permeabilization step, anti-TLR9 mAB (BD, Pharmigen®, San Diego, CA) was added and incubated at 4°C for 30 minutes and protected from light. After incubation, 2 mL Perm/Wash 1x concentrate (BD, Cytofix / Cytoperm TM Becton Dickinson, Sunnyvale, CA) was centrifuged at 300 xg for 5 minutes at 20°C (FACSVERSE, Becton Dickinson, Sunnyvale, CA). A total of 50,000 cellular events were acquired and the analyzes of the results were performed with BD FACS Suite (Becton Dickinson, Sunnyvale, CA) and expressed in mean fluorescence intensity (MFI).

3 STATISTICAL ANALYSES

The p value was calculated for the association of socio-demographic variables, a history of skin cancer, chemical exposures, Fitzpatrick skin type classification, UVBs, and SCC on areas of photo-exposed skin in adults and older people. The Chi-square and Fisher tests were applied. For the variables of age and BMI, the Student's t-test was applied. Variables with a p value <0.05 were considered as associated.

In the MFI analysis for TLR9, the Shapiro-Wilk normality test was initially applied. A non-normal distribution of TLR9 expression was observed through the MFI among cellular groups, and was expressed as median and interquartile (IQR: 25%-75%). The Mann-Whitney test was used to compare median values between the cell groups. The level of statistical significance was set at p <0.05. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 6.0 (Graphpad software, San Diego, CA).

4 RESULTS

4.1 Clinical and Demographic Characteristics of SCC and Control patients

UVBs was observed in 80% of the SCC patients and in 12.5% of the controls (p-value <0.0001). Male patients accounted for 73.4% of the SCC cases and 31.2% of the controls (p-value <0.012). The mean age was 70 ($\pm$ 13) years in SCC patients and 47.2 ($\pm$ 12.5) in the controls (p-value <0.0001). Fitzpatrick classifications I and II skin types were observed in 94.7% of the SCC patients and in 37.5% of the controls (p-value <0.0001). Table 1.

4.2 Analysis of the TLR9 expression in SCC and control patients

In the analysis of the TLR9 expression in circulating leukocytes, it was observed that the TLR9 MFI of total lymphocytes was lower in patients with SCC when compared to the controls (p=0.04). There was no statistical difference in TLR9 MFI in total leukocytes, monocytes, granulocytes and B cells between the SCC patients and controls, as presented in **Figure 1**.

4.3 Analysis of the TLR9 expression in the UVBs and UVBR patients

It was observed that the TLR9 MFI in total leukocytes, total lymphocytes and B cells was lower in UVBs patients when compared to UVBR ($p = 0.01$, 0.004 and 0.01 , respectively). There was no statistical difference in the TLR9 expression in monocytes and granulocytes between UVBs and UVBR groups, as shown in **Figure 2**.

4.4 Discussion

In this study, we observed that the majority of patients with SCC presented with UVBS, Fitzpatrick skin types I and II, were elderly males. In the SCC patients, the MFI of the TLR9 expression in total lymphocytes found in peripheral blood was lower when compared to the controls. The UVBs patients also presented a lower MFI of the TLR9 expression in total leukocytes and lymphocytes, and in B cells when compared to UVBR.

The TLR9 expression may be evaluated in cells of the immune system such as monocytes, neutrophils and lymphocytes in peripheral blood and in keratinocytes of the skin, mucosa, or epithelial cells in the lining of the digestive system, lungs, cervix or carcinomatous cells. [9] In the present study we measured the MFI in the peripheral blood of SCC cases from the photo-exposed skin of adults and older people and in the controls. Moreover, in the peripheral cells of the immune system, we were able to observe the TLR9 expression, representing the tumor microenvironment of the SCC on skin exposed to UVBR both in the SCC cases and in the controls without SCC.

Attention is drawn to the lower TLR9 expression in the total lymphocytes of SCC patients in photo-exposed skin when compared to the controls and the TLR9 expression was much more damaged in UVBs patients when compared to UVBR, where we observed the lowest TLR9 expression in total lymphocytes, total leukocytes and B cells. We therefore hypothesized that a decrease in the TLR9 expression may be more intensely damaged by exposure to UVBR and UVBs. The control and UVBRs patients were characterized by a higher TLR9 expression and presented reactivity to the contact test assessed between 21 and 28 days after applying the DPCP antigen on previously irradiated skin, representative of resistance to UVBR, due to the integrity of the innate and adaptive immune systems.

Squamous cell carcinoma is associated with chronic exposure to UVBR and cumulative effects, and to UVBs, promoting cell infiltration and the production of pro-inflammatory cytokines and metabolites involved in the initiation, promotion and progression of oncogenesis. [27-31] It is known that UVBR induces oxidative stress and SCC by activating nuclear factor- κ B (NF- κ B), which is a transcription factor that regulates TLR9 expression, which we observed to be lower in UVBs and in SCC on photo-exposed skin. [32] We therefore suggest that possible changes with a reduction in TLR9 transcription via NF- κ B, may occur due to exposure to RUVB in UVBs patients. However, some authors have reported an absence of TLR9 in the epithelial cells unexposed to UVBR in cervical SCC, thus indicating the possibility of other associated factors besides exposure to UVBR and UVBs. Further research is needed to investigate other factors involved with the innate immune response, the favorable or unfavorable TLR9 expression to carcinogenesis, which may demonstrate the response profile in UVBs and UVBR. [12, 23]

Although we included a mixed population, we observed that the characteristics of skin color, eyes and light hair and a predisposition to burning and the inability to tan, as outlined in the Fitzpatrick classification of skin types I and II, predominated in our results, thereby representing further evidence regarding the participation of UVBR associated with the risk of SCC in Caucasians.

One curious fact observed was the mean age of 70 years, which characterized the group of SCC patients. Thus, we hypothesized that age may be an important factor in reducing the expression of TLR9 in SCC in photo-exposed skin. Senescent skin exhibits ultrastructural changes as a result of age, and our population of SCC patients presented a mean age of 70 years. [33] This would suggest that the reduced TLR9 expression in the SCC may also be associated to age. Squamous cell carcinoma on photo-exposed skin occurs more frequently from the age of 60, and in this age group we observe anatomical instability of the skin, in addition to the ultrastructural changes that occur with aging, leading to cutaneous immunosenescence in the older population and a predisposition to SCC, especially in tropical countries. [34] Changes are observed in the expression and function of TLRs in some cell types, signaling changes in the regulation of the immune system in aging, and in human plasmacytoid dendritic cells (pDCs) a decline has also been observed in the TLR9 expression in aging. [35, 34]

The risk of developing SCC is greater in males, and Chen [24] who studied the forms of exposure between the sexes, observed differences between genders, where sun exposure throughout a life time was more related to the risk of SCC in women, whereas early-onset sun exposure was more

related to the risk of SCC in males. Genetic risk determinants of different NMSC by gender in UVBR-induced immune suppression have also been reported. [36] For Rudolph [37], the incidence of SCC is on the rise in both sexes worldwide, however, the rise is predominantly female.

In view of the results, we conclude in this study that there is a reduction in the expression of TLR9, as demonstrated in cells of the immune system, in peripheral blood, the MFI, in SCC on the photo-exposed skin of adults and older people, and more intensely in UVBs. This indicates the possibility of the role of TLR9 in the mechanisms involved in the deficient innate immune response to UVB exposure and in the mechanisms of UVBs, and also in the tumorigenesis of SCC in photo-exposed skin of adults and older people. The mean age of 70 years observed in the SCC patients may also be associated with deficient TLR9 expression.

Further research is needed to clarify how this response is formulated involving the factors related to UVBR exposure and UVBs, and the association with TLR9 expression and to test for TLR9 expression in peripheral blood and SCC in the photo-exposed skin of adults and older people with a greater number of patients.

5 DECLARATION OF CONFLICT OF INTEREST

The authors hereby declare they have no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to express our sincere thanks to the patients and families who have contributed by believing in new scientific knowledge related to skin cancer, and in improving people's health and quality of life.

REFERÊNCIAS

- 1 B. K. Armstrong, A. Krickler, The epidemiology of UV induced skin cancer, J Photochem Photobiol B. 63 (2001) 8-18. Doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S1011-1344\(01\)00198-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1011-1344(01)00198-1)
- 2 Brasil, Ministério da Saúde, Estimativa 2014: incidência de câncer no Brasil, Brasília, 2014.
- 3 T. Yoshikawa, I. Kurimoto, J. W. Streilein, Tumour necrosis factor-alpha mediates ultraviolet light B-enhanced expression of contact hypersensitivity, Immunology. 76 (1992) 264-271.

- 4 I. Kurimoto, J. W. Streilein, Characterization of the immunogenetic basis of ultraviolet-B light effects on contact hypersensitivity induction, *Immunology*. 81 (1994) 352-8.
- 5 T. Yoshikawa, V. Rae, W. Bruins-Slot, J-W. Van den Berg, J. R. Taylor, J. W. Streilein, Susceptibility to effects of UVB Radiation on Induction of Contact Hypersensitivity as a Risk Factor for Skin Cancer in Humans, *J Invest Dermatol*. 95 (1990) 530-536.
- 6 H. G. Rebel, C. A. Bodmann, G. C. Van de Glind, F. R. Gruijl, UV-induced ablation of the epidermal basal layer including p53-mutant clones resets UV carcinogenesis showing squamous cell carcinomas to originate from interfollicular epidermis, *Carcinogenesis*. 33 (2012) 714–20. DOI: 10.1093/carcin/bgs004.
- 7 E. C. De Fabo, F. B. Noonan, Mechanism of immune suppression by ultraviolet irradiation in vivo. I. Evidence for the existence of a unique photoreceptor in skin and its role in photoimmunology, *J Exp Med*. 158 (1983) 84-98. DOI: 10.1084/jem.158.1.84.
- 8 C. Hernandez, P. Huebener, F. Robert, F Schwabe, Damage-associated molecular patterns in cancer: A double edged sword. *Oncogene*. 35 (2016) 5931–5941. DOI:10.1038/onc.2016.104.
- 9 B. Huang, J. Zhao, H. Li, K. L. He, Y. Chen, S. H. Chen, L. Mayer, J. C. Unkeless, H. Xiong, Toll-like receptors on tumor cells facilitate evasion of immune surveillance. *Cancer research*. 65 (2005) 5009–5014. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-0784
- 10 Y. Ben-Neriah, M. Karin, Inflammation meets cancer, with NF- κ B as the matchmaker. *Nat Immunol*. 12 (2011) 715-23. DOI: 10.1038/ni.2060.
- 11 J-P. Pradere, D. H. Dapito, R. H. Schwabe, The Yin and Yang of Toll-like Receptors in Cancer. *Oncogene*. 33 (2014) 3485–3495. DOI:10.1038/onc.2013.302.
- 12 F. Takeshita, K. Suzuki, S. Sasaki, N. Ishii, D. M. Klinman, K. J. Ishii, Transcriptional regulation of the human TLR9 gene, *J. Immunol*. 173(2004) 2552-2561.
- 13 J. Tian, A. M. Avalos, S-Y. Mao, B. Chen, K. Senthil, H. Wu, Toll-like receptor 9–dependent activation by DNA-containing immune complexes is mediated by HMGB1 and RAGE, *Nat. Immunol*. 8 (2007) 487 – 496.
- 14 C. Bangert, P. M. Brunner, G. Stingl G. Immune function of the skin. *Clin Dermatol*. 29 (2011) 360-76. DOI: 10.1016/j.clindermatol.2011.01.006.

15. S. K. S. Katiyar, S. D. Meleth, Sharma, Silymarin, a Flavonoid from Milk Thistle (*Silybummarianum L.*), Inhibits UV-induced Oxidative Stress Through Targeting Infiltrating CD11b⁺ Cells in Mouse Skin, *Photochem. Photobiol.* 84(2008) 266–271. DOI: 10.1111/j.1751-1097.2007.00241.x.
- 16 R. Sluyter, G. M. Halliday. Infiltration by inflammatory cell srequired for solar-simulated ultraviolet radiation enhancement of skin tumor growth. *Cancer Immunol. Immunother.* 50 (2001) 151-156. DOI: 10.1007/PL00006685
- 17 V. S. Kotrashetti, R. Nayak, K. Bhat, J. Hosmani, P. Somannavar, *Biotech Histochem.* 88 (2013) 311-322. DOI: 10.3109/10520295.2013.785592.
- 18 R. Min, L. Siyi, Y. Wenjun, L. Shengwen, A. Ow, W. Lizheng, Z. Chenping, Toll-like receptor-9 agonistsincreasecyclin D1 expression part lythrough activation of activator protein-1 in human oral squamous cell carcinoma cells, *CancerSci.* 103 (2012) 1938-45. DOI: 10.1111/j.1349-7006.2012.02394.x.
- 19 H. Frenzel, B. Hoffmann, C. Brocks, P. Schlenke, R. Pries, B. Wollenberg, Toll-like receptor interference in myeloid dendriti ccell sthrough head and neck cancer, *Anticancer Res.* 26 (2006) 4409-13.
- 20 J. Sheyhidin, G. Nabi, A. Hasim, R. P. Zhang, J. Ainiwaer, H. Ma, H. Wang, Over expression of TLR3, TLR4, TLR7 and TLR9 in esophageal squamous cell carcinoma, *World J Gastroenterol.* 17 (2011) 3745-51. DOI: 10.3748/wjg.v17.i32.3745.
- 21 L. Belmont, N. Rabbe, M. Antoine, D. Cathelin, C. Guignabert, J. Kurie, J. Cadranel, M. Wislez, Expression of TLR9 in tumor-infiltrating mononuclear cells enhance sangio genesis and is associated with a worse survival in lung cancer. *Int J Cancer.* 134 (2014) 765-77. DOI: 10.1002/ijc.28413.
- 22 A. Ghosh, A. Dasgupta, A. Bandyopadhyay, T. Ghosh, R. Dalui, S. Biswas, U. Banerjee, A. Basu, A study of the expression and localization of toll-like receptors 2 and 9 in different grades of cervical intraepithelial neoplasia and squamous cell carcinoma. *Exp Mol Pathol.* 99 (2015) 720-4. DOI: 10.1016/j.yexmp.2015.11.015.
- 23 M. M. Kumar, S. Adurthi, S. Ramachandran, G. Mukherjee, O. Joy, H. Krishnamurthy, S. Krishna, U. D. Bafna, D. K., D. K. Uma, R. S. Jayshree, Toll-likereceptors 7, 8, and 9 expression and function in cervical cancer Langerh ans cells: evidence of anergy, *Int. J. Gynecol. Cancer.* 23 (2013) 184-192. DOI: 10.1097/IGC.0b013e31827a2003.

- 24 X. Chen, S. Wang, L. Liu, Z. Chen, F. Qiang, Y. Kan, Y. Shen, J. Wu, H. Shen, Z. Hu, A genetic variant in the promoter region of Toll-like receptor 9 and cervical cancer susceptibility. *DNA Cell Biol.* 31 (2012) 766-71. DOI: 10.1089/dna.2011.1427.
- 25 W. Lee, J. J. Choi, E. S. Seo, M. J. Kim, W. Y. Kim, C. H. Choi, T. J. Kim, B. G. Kim, S. Y. Song, D. S. Bae, Increased toll-like receptor 9 expression in cervical neoplasia. *Mol Carcinog.* 46 (2007) 941-7. DOI:10.1002/mc.20325.
- 26 I. Ahmad, E. Simanyi, P. Guroji, Toll-Like Receptor-4 deficiency enhance srepar of ultraviolet radiation induced cutaneous DNA damage by nucleotide excision repair mechanism. *J Invest Dermatol.* 134 (2014) 1710–7. DOI:10.1038/jid.2013.530.
- 27 U. Leiter, C. Garbe, Epidemiology of melanoma and nonmelanoma skin cancer--the role of sunlight, *Adv Exp Med Biol.* 624 (2008) 89-103. DOI: 10.1007/978-0-387-77574-6_8.
- 28 D. S. Rigel, R. J. Friedman, A. W. Kopf. Lifetime risk for development of skin cancer in the US population: current estimate is now 1 in 5. *J. Am. Acad. Dermatol.* 35 (1996) 1012–13. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0190-9622\(96\)90139-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0190-9622(96)90139-5).
- 29 D. S. Rigel, Cutaneous ultraviolet exposure and its relationship to the development of skin cancer, *J Am Acad Dermatol.* 58 (2008) S129-32. DOI: 10.1016/j.jaad.2007.04.034.
- 30 S. M. Meeran, T. Punathil , S. K., IL-12 deficiency exacerbates inflammatory responses in UV-irradiated skin and skin tumors, *J. Invest. Dermatol.* 128 (2008) 2716-2727. DOI: 10.1038/jid.2008.140.
- 31 Y. Kima, Y-Y. He, Ultraviolet radiation-induced non-melanoma skin cancer: Regulation of DNA damage repair and inflammation, *Genes Dis.* 1(2014) 188-198.
- 32 J. W Wang, J. Ouyang, J.Li. Loss of Tumor Suppressor p53 Decreases PTEN Expression and Enhances Signaling Pathways Leading to Activation of Activator Protein 1 and Nuclear Factor κ B Induced by UV Radiation. *Cancer Res.* 65 (2005) 6601-11. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-4184
- 33 F. Olivieri, A. D. Procopio, R. R. Montgomery, Effect of agging on micro RNAs and regulation of pathogen recognition receptors. *Current Opinion in Immunology.* 29 (2014) 29-37. DOI: 10.1016/j.coi.2014.03.006.
- 34 Y. Jing, E. Shaheen, R. R. Drake, N. Chen, S. Gravenstein, Y. Deng, Aging is Associated with a numerical and Functional Decline in Plasmocitoid Dendritic Cells, whereas mieloide

dendritic cells are relatively unaltered in human peripheral blood. *Hum Immunol.* 70 (2009) 777-784. DOI:10.1016/j.humimm.2009.07.005

35 A. C. Shaw, D. G. Goldstein, R. R. Montgomery, Dysregulated innate immune function in aging. *Nat Rev Immunol.* 13 (2013) 875-87. DOI: 10.1016/j.coi.2010.05.003.

36 M. M. Welsh, M. R. Karagas, J. K. Kuriger, A. Houseman, S. K. Spencer, A. E. Perry et al., Genetic Determinants of UV-Susceptibility in Non-Melanoma Skin Cancer, *PLoS ONE.* 6 (2011) 20019. DOI:10.1371/journal.pone.0020019.

37 C. Rudolph , M. Schnoor , N. Eisemann, Incidence trends of nonmelanoma skin cancer in Germany from 1998 to 2010. *J Dtsch Dermatol Ges.* 2015;13(8):788-797. doi: 10.1111/ddg.12690.

FIGURES

Figure 1: Values of the mean fluorescence intensity (MFI) of TLR9 in total leukocytes, total lymphocytes, monocytes, granulocytes and B cells in patients with SCC and controls. The Shapiro Wilk's normality test was performed. The graphs are represented in median and interquartile 25-75%. $P < 0.05$ was considered significant. Ns: not significant.

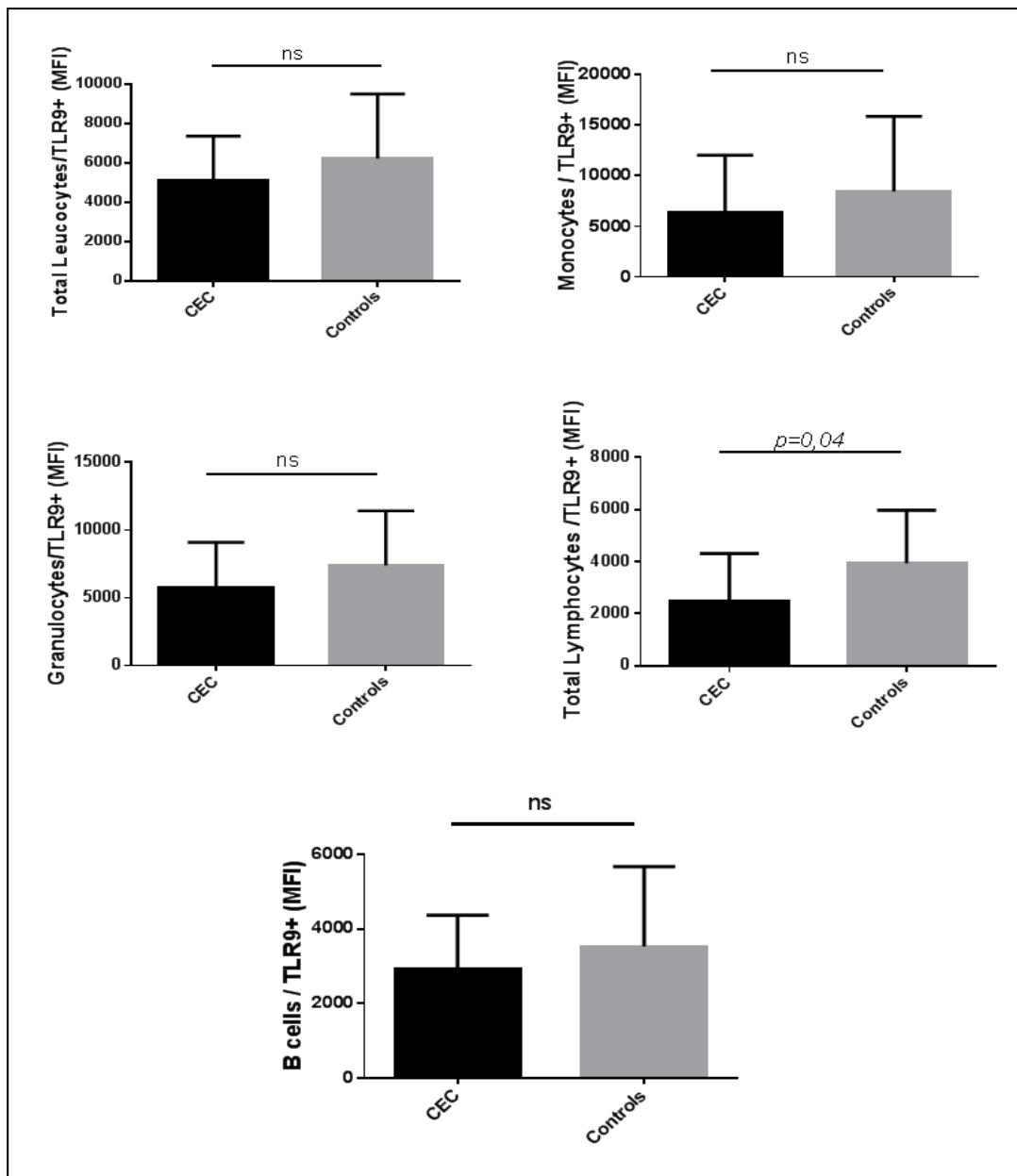


Figure 2: Values of the mean fluorescence intensity (MFI) of TLR9 in total leukocytes, total lymphocytes, monocytes, granulocytes and B cells in UVBR and UVBS patients. The Shapiro Wilk's normality test was performed. . The graphs are represented in median and interquartile 25-75%. P <0.05 was considered significant. Ns: not significant.

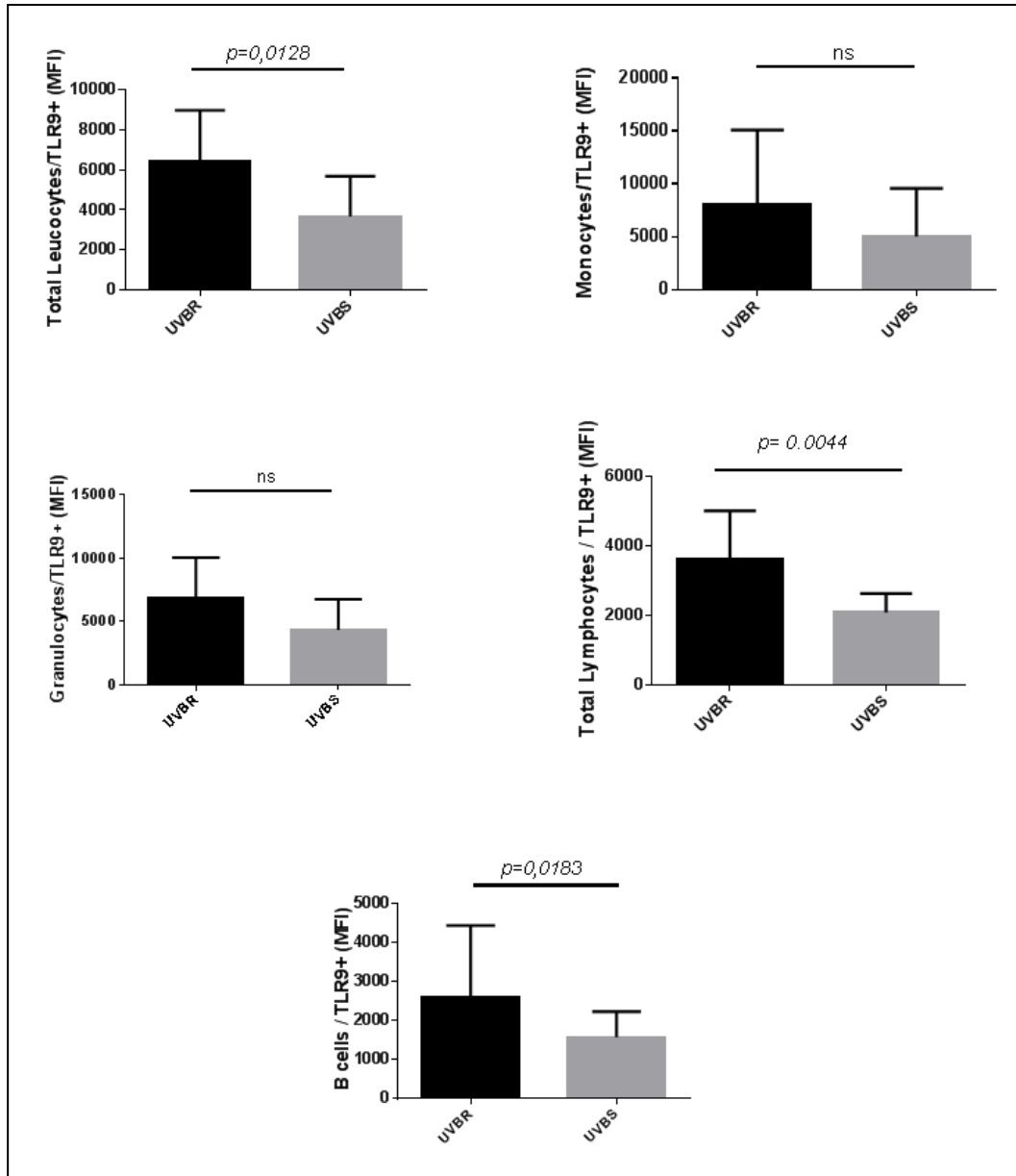


Table 1. Socio-demographic characteristics, History of skin cancer in the family, chemical exposure, UVBR burn, Fitzpatrick skin type, UVBS and SCC in Cases and Controls analyzed

Variables	SCC		p-value
	Yes (n = 19)	No (n = 16)	
UVB			
Resistent	3 (20.0%)	14 (87.5%)	0.000
Susceptible	12 (80.0%)	2 (12.5%)	
Sex: Male	14 (73.4%)	5 (31.2%)	0.012
Age	70.0 ± 13.3	47.2 ± 12.5	0.000
BMI	26.1 ± 3.2	26.8 ± 3.7	0.540
History of skin cancer in the family			
No	0 (-)	3 (18.7%)	0.101
Yes	19 (100%)	13 (81.3%)	
Smoker			
Never smoked	9 (52.9%)	14 (87.5%)	0.031
Currently a smoker or have been	8 (47.1%)	2 (12.5%)	
How many cigarettes (years/pack)			
Never smoked	9 (60.0%)	14 (87.5%)	0.060
Less than 35	6 (40.0%)	1 (6.3%)	
More than 35	0 (-)	1 (6.3%)	
Exposure to arsnic			
No	1 (5.3%)	0 (%)	0.352
Yes	18 (94.7%)	16 (100%)	

Job^a			
Others	12 (63.2%)	14 (87.5%)	0.101
Agriculture	7 (36.8%)	2 (12.5%)	
Fitzpatrick skin type classification			
III to VI	1 (5.3%)	10 (62.5%)	0.000
I and II	18 (94.7%)	6 (37.5%)	
Previously burned			
No	14 (73.7%)	13 (81.2%)	0.595
Yes	5 (26.3%)	3 (18.8%)	

APÊNDICE B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE)****TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO****(MODELO PARA MAIORES DE 18 ANOS)**

Convidamos o (a) Sr.(a) _____

para participar, como voluntário (a), da pesquisa A UVB-SUSCETIBILIDADE, O HPV BETA E A EXPRESSÃO RLT9 ASSOCIADOS AO CARCINOMA ESPINOCELULAR EM ÁREAS DE PELE FOTOEXPOSTA DE ADULTOS IMUNOCOMPETENTES que está sob a responsabilidade da pesquisadora Mecciene Mendes Rodrigues, que reside à Avenida Boa Viagem, 1716/Ap401 - Boa Viagem-Recife-PE; CEP: 51111-040; Telefone: (81) 9167-9416; e-mail: mecciene@gmail.com, para contato da pesquisadora responsável (inclusive ligações a cobrar) e está sob a orientação do Prof. Dr. Ricardo Arraes de Alencar Ximenes; Telefones para contato: (81) 8852-4009, e-mail: ricardo.ximenes@pq.cnpq.br. Também participa desta pesquisa a Dra. Danyelly Bruneska, pesquisadora do LIKA. Telefone: (81) 8842-5594 e a Dra. Leuridan Cavalcanti, pesquisadora do IMIP. Telefone: 99659-6766. Após ser esclarecido (a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, rubrique as folhas e assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é da pesquisadora responsável. Em caso de recusa o (a) Sr.(a) não será penalizado (a) de forma alguma. O (a) Senhor (a) tem o direito de retirar o consentimento a qualquer tempo, sem qualquer penalidade.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

O objetivo da pesquisa é diagnosticar pessoas com câncer de pele chamado carcinoma espinocelular (CEC) e identificar se essas pessoas são mais sensíveis aos efeitos da Radiação do sol chamada ultravioleta; vamos pesquisar a infecção da pele com o vírus HPV e verificar se juntos a radiação solar e o vírus podem causar o câncer de pele chamado carcinoma espinocelular (CEC). Será realizada a rotina normal de coleta de dados da história clínica da sua doença e realizado o exame de pele para verificar a presença de lesões de câncer que deverão ser imediatamente tratadas através da retirada cirúrgica, a biópsia, e enviado o material para estudo por exame histopatológico e pesquisa do vírus HPV. Para o teste do HPV vamos precisar realizar um swab – raspado superficial- da pele do dorso da mão que é exposta à radiação solar.

Para observar se a pessoa tem mais sensibilidade à radiação solar ultravioleta será realizada exposição da pele à uma pequena dose de radiação ultravioleta, em pequena área da região das costas por alguns segundos. Essa dose de radiação solar é bem menor do que aquela que levamos diariamente ou que é preconizada para tratamentos de algumas doenças de pele. No dia seguinte será realizado exame para identificar área da pele levemente avermelhada e na área próxima será realizado um teste de alergia de contato que, como todo teste de contato, deve resultar em área vermelha ou presença de pequenas bolhas localizadas e coceira leve/moderada. A substância do teste de contato é a chamada difenciprona e também é utilizada em dermatologia para tratamento de alguns casos de queda de cabelo. Como todo teste alérgico de contato, o sr(a) pode sentir coceira de leve/moderada intensidade.

A parte da pesquisa referente à realização dos exames deve durar em média 30 dias, assim distribuídos: a primeira consulta que é essa que estamos realizando com exame clínico e solicitação de exames de rotina, procedemos também à exposição à luz ultravioleta, com

retorno no dia seguinte para a segunda consulta, quando deve ser observado resultado dessa exposição representado por pele levemente vermelha apenas na área de aplicação e em seguida será aplicado o primeiro teste de contato com a difenciprona em área próxima. Será marcada a retirada cirúrgica em dois dias, na terceira consulta. Nessa terceira consulta será realizada a retirada cirúrgica da lesão suspeita de CEC e enviado o material para exame histopatológico e pesquisa do HPV; será realizada a leitura do teste de contato. O retorno, quarta consulta, será com 21-28 dias contando com o tempo necessário para a realização de todos os exames de sangue de rotina, inclusive do histopatológico, quando indicado. Nessa ocasião será realizado um segundo teste alérgico de contato para saber se a pessoa tem sensibilidade ou é resistente à exposição à radiação solar ultravioleta; a leitura será após dois dias, na quinta consulta.

Os riscos limitam-se à irritação na pele pela exposição ao antígeno de contato, a difenciprona, com sinal de leve/moderada inflamação e sintoma de prurido localizado. Há o risco inerente a todo procedimento de pequena cirurgia para a retirada do tumor, quando necessário. Para qualquer dessas alterações se ocorrerem danos devido aos procedimentos realizados nos comprometemos à proceder ao tratamento necessário.

O sr (a) será beneficiado diretamente com o diagnóstico e tratamento de lesões de pele suspeitas de câncer. Se beneficiará em saber se tem predisposição ao câncer de pele ou à infecções por vírus e outros agentes pela exposição à radiação do sol.

As informações desta pesquisa serão confidenciais e serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação dos voluntários, a não ser entre os responsáveis pelo estudo, sendo assegurado o sigilo sobre a sua participação. Os dados coletados nesta pesquisa referentes às entrevistas ficarão armazenados em pastas de arquivo

no computador pessoal e na Instituição Hospital de Câncer - PE, sob a responsabilidade da pesquisadora e do orientador, no endereço acima informado por período de no mínimo 5 anos. O (a) senhor (a) não pagará nada para participar desta pesquisa. Se houver necessidade, as despesas de passagens para a sua participação serão assumidos pelos pesquisadores. Fica também garantida indenização em casos de danos, comprovadamente decorrentes dos testes realizados para participação na pesquisa, conforme decisão judicial ou extra-judicial.

Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE e do HCP, no endereço: **(Avenida da Engenharia s/n – 1º Andar, sala 4 - Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-600, Tel.: (81) 2126.8588 – e-mail: cepccs@ufpe.br).**

(assinatura da pesquisadora)

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO VOLUNTÁRIO (A)

Eu, _____, CPF _____, abaixo assinado, após a leitura (ou a escuta da leitura) deste documento e ter tido a oportunidade de conversar e ter esclarecido as minhas dúvidas com a pesquisadora responsável, concordo em participar do estudo A UVB-SUSCETIBILIDADE ASSOCIADA AO PAPILOMAVÍRUS HUMANO GÊNERO BETA COMO FATOR DE RISCO PARA O CARCINOMA ESPINOCELULAR EM ÁREAS DE PELE FOTOEXPOSTAS DE ADULTOS IMUNOCOMPETENTES, como voluntário (a). Fui devidamente informado (a) e esclarecido (a) pela pesquisadora sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade (ou interrupção de meu acompanhamento/assistência/tratamento).

Impressão digital

(opcional)

Local e data _____

Assinatura do participante (ou responsável legal):

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e aceite do voluntário em participar.

(02 testemunhas não ligadas à equipe de pesquisadores):

Nome:

Assinatura:

Nome:

Assinatura

APÊNDICE C – QUESTIONÁRIO

UVB-SUSCETIBILIDADE ASSOCIADA AO PAPILOMAVÍRUS HUMANO GÊNERO BETA COMO FATOR DE RISCO PARA O CARCINOMA ESPINOCELULAR INTRAEPITELIAL E MICROINVASIVO E QUERATOSE ACTÍNICA NA PELE FOTOEXPOSTA EM ADULTOS IMUNOCOMPETENTES

QUESTIONÁRIO No.

--	--	--

Data da entrevista:

--	--	--	--	--	--

PRONTUÁRIO

--	--	--	--	--	--

QUAL É O SEU NOME COMPLETO?

Qual a sua data de nascimento?

--	--	--	--	--	--

Endereço:

.....

.....

.....

.....

.....

.....

CEP:

Fone fixo: Cel: 1:.....Cel 2:.....

1. SELECIONADO (A) COMO:

1. CASO

2. CONTROLE

--

2. Sexo:

1. () Feminino

2. Masculino ()

--

3. Quantos anos o Sr. (a) tem?

4. Qual o local o Município/Estado onde o Sr. (a) mora? (Lista à parte)

5. Região Geográfica

1. Metropolitana
2. Litorânea
3. Mata
4. Agreste
5. Sertão

6. Sua residência/casa fica na cidade ou na zona rural como sítio?

1. ZONA RURAL
2. ZONA URBANA

Qual a cidade em que o Sr (a) nasceu? (Lista à parte)

7. O Sr (a) sabe ler e escrever?

1 – Sim

2 – Não

8. O Sr (a) frequenta ou já frequentou escola?

- 1 – Sim, Rede Particular
- 2 – Sim, Rede Pública
- 3 – Não atualmente, mas, já frequentei escola Particular
- 3 – Não atualmente, mas, já frequentei escola Pública
- 4 – Não atualmente, e nunca frequentei

9. Qual foi o último nível do curso que o Sr (a) frequentou?

1. Alfabetização de adultos
2. Ensino Fundamental I (II ao VI ano)
3. Ensino Fundamental II (VII ao IX ano)
4. Ensino Médio
5. Supletivo
6. Pré-Vestibular
7. Ensino Superior
8. Mestrado ou Doutorado
9. Não se aplica

10. Qual o nível que frequentou completo?

1. Alfabetização de adultos
2. Ensino Fundamental I (II ao VI ano)
3. Ensino Fundamental II (VII ao IX ano)
4. Ensino Médio
5. Supletivo
6. Pré-Vestibular
7. Ensino Superior
8. Mestrado ou Doutorado

9. Não se aplica

11. Quantos anos de estudo?

- 1 – Um ano
- 2 – Dois anos
- 3 – Três anos
- 4 – Quatro anos
- 5 – Cinco anos
- 6 – Seis anos
- 7 – Sete anos
- 8 – Oito anos
- 9 – Nove anos
- 10 – Dez anos
- 11 – Onze anos
- 12- Doze ou mais (superior)
- 13 – Não se aplica

--	--

12. O Sr. (a) tem emprego, trabalho fixo ou tem alguma ocupação?

1. Sim 2. Não

--

13. O Sr (a) é aposentado (a)?

1. Sim 2. Não 3. Não se aplica

--

14. O seu emprego/trabalho é em local fechado ou aberto? Vou ler as opções e o Sr (a) escolhe onde mais se encaixa com o seu local de trabalho.

- 1. Ambientes fechados tal como escritório?
- 2. Em ambiente aberto, mas com cobertura/teto que protege da exposição direta ao Sol?
- 3. Em ambiente aberto e sem nenhuma cobertura/teto ou proteção do sol?
- 4. Parte em ambiente fechado e parte em ambiente aberto?
- 5. No momento não trabalha exposto (a) ao sol, mas, já trabalhou

--

15. O seu trabalho/ocupação o (a) Sr. (a) é na:

- 1. Na indústria de fundição?.....
- 2. Na indústria de mineração?.....
- 3. Na indústria farmacêutica com compostos/drogas arsênicas?.....
- 4. Na geração de eletricidade à partir do carvão?.....
- 5. Na agricultura com herbicidas?.....
- 6. Na agricultura com inseticidas?.....
- 7. Na agricultura com dessecantes?
- 8. Na agricultura com preservativos para a madeira?.....
- 9. Na agricultura com estimulantes de crescimento para plantas e animais?
- 10. Na agricultura sem herbicidas, ou inseticidas, ou algicidas, ou dessecantes, ou preservativos ou estimulantes?.....
- 11. Na agricultura com herbicidas, ou inseticidas, ou algicidas, ou dessecantes, ou preservativos ou estimulantes?
- 12. Na agricultura do arroz.....
- 13. Na carpintaria.....
- 14. Na engenharia de construção:
- 15. Autônomo:.....
- 16. Outros
- 17. NA

--	--

16. Há quanto tempo o Sr (a) está nesse emprego/trabalho em ambiente aberto exposto ao sol?

1. Anos
2. Meses
3. Semanas
4. Dias
5. NA

☐

17. Há quantos anos o sr (a) trabalha foi exposto (a) ao sol?

1. Menor que 10 anos
2. Dez anos ou mais
3. NA

☐

18. De que horas o Sr (a) inicia e termina o seu trabalho em ambiente aberto exposto ao sol?

-
1. 0 horas
 2. Menor que 4 horas
 3. 4 horas ou mais
 4. NA

☐

SE NÃO É EXPOSTO OU NÃO TRABALHA ATUALMENTE PERGUNTAR QUANTO ÀS EXPOSIÇÕES NO PASSADO:

19. Vou ler as opções de exposição ao sol e o Sr (a) escolhe onde mais se encaixa com o seu local de trabalho no passado.

☐

1. Em ambiente aberto, mas com cobertura/teto que protege da exposição direta ao Sol?
2. Em ambiente aberto e sem nenhuma cobertura/teto ou proteção do sol?
3. Parte em ambiente fechado e parte em ambiente aberto?
4. NA

20. O trabalho/ocupação do (a) Sr. (a) era:

1. Na indústria de fundição?.....
2. Na indústria de mineração?.....
3. Na indústria farmacêutica com compostos/drogas arsênicas?.....
4. Na geração de eletricidade à partir do carvão?.....
5. Na agricultura com herbicidas?.....
6. Na agricultura com inseticidas?.....
7. Na agricultura com dessecantes?
8. Na agricultura com preservativos para a madeira?.....
9. Na agricultura com estimulantes de crescimento para plantas e animais?
10. Na agricultura sem herbicidas, ou inseticidas, ou algicidas, ou dessecantes, ou preservativos ou estimulantes?.....
11. Na agricultura com herbicidas, ou inseticidas, ou algicidas, ou dessecantes, ou preservativos ou estimulantes?
12. Na agricultura do arroz?.....
13. Na carpintaria?.....
14. Na engenharia de construção:
15. Autônomo:.....
16. Outros
17. NA

☐

21. Por quanto tempo o Sr (a) ficou nesse emprego/trabalho em ambiente aberto exposto ao sol?

1. Anos
2. Meses
3. Semanas
4. Dias
5. NA

☐

22. Por quantos anos o sr (a) trabalhou exposto (a) ao sol?

1. Menor que 10 anos

☐

2. Dez anos ou mais
3. NA

23. De que horas o Sr (a) iniciava e terminava o seu trabalho em ambiente aberto exposto ao sol?

.....

1. Menor que 4 horas
2. 4 horas ou mais
3. NA

--	--

24. Em seu trabalho o Sr (a) se expõe/expôs a um produto chamando arsênico?

1. Sim
2. Não
3. Não se aplica

--

25. Quantas pessoas moram em sua casa?

26. De todas as pessoas que vivem em sua casa quantas têm alguma fonte de renda: trabalham ou recebem salário ou alguma quantia por trabalho, emprego ou atividade, mensalmente?

27. De todas as pessoas que vivem em sua casa quantas são aposentadas?

28. Quanto cada pessoa recebe por mês?

--	--

1. _____
2. _____
3. _____
4. _____
5. _____
6. _____
7. _____
8. _____
9. _____
10. _____

--	--	--	--	--	--	--

--	--	--	--	--	--	--

--	--	--	--	--	--	--

--	--	--	--	--	--	--

--	--	--	--	--	--	--

--	--	--	--	--	--	--

--	--	--	--	--	--	--

--	--	--	--	--	--	--

--	--	--	--	--	--	--

--	--	--	--	--	--	--

29. Renda familiar

--	--	--	--	--	--	--

TABACO FUMADO

Agora eu gostaria de fazer algumas perguntas sobre o uso de produtos do tabaco que são fumados tais como: cigarros, charutos, cigarilhas, cigarros indianos (ou bidis) e narguilé (ou cachimbo d'água). Por favor, não responda sobre produtos de tabaco que não fazem fumaça, como rapé e fumo para mascar. Não considere, também, cigarros de maconha.

30. Atualmente, o Sr. ou a Sra. fuma algum produto do tabaco?

1. Diariamente
2. Menos que diariamente
3. Não fuma

--

31. No passado, o Sr. ou Sra. fumou algum produto do tabaco diariamente?

1. Sim
2. Não

--

32. No passado, o Sr. ou Sra. fumou algum produto do tabaco?

1. Diariamente
2. Menos que diariamente
3. Nunca fumou

☐

Caso informe que já usou diariamente e também menos que diariamente no passado, assinale diariamente.

A pergunta que farei a seguir refere-se apenas a cigarros

33. Somando todos os cigarros que o Sr (a) fumou a vida inteira, o total chega a 5 maços ou 100 cigarros?

1. Sim
2. Não
3. Nunca fumou cigarros

☐

USUÁRIO DIÁRIO DE TABACO FUMADO

Pense novamente em todos os tipos de produtos do tabaco que são fumados: cigarros e também charutos, cigarrilhas, cigarros de cravo (ou de Bali), cigarros indianos (ou bidis) e narguilé (ou cachimbo d'água). Por favor, não responda sobre produtos de tabaco que não fazem fumaça, como rapé e fumo de mascar. Não considere também cigarros de maconha.

34. Que idade tinha quando começou a fumar algum produto do tabaco mesmo que de vez em quando?

1. Anos:.....
2. Não sabe/ Não lembra

☐

35. Que idade tinha quando o Sr (a) começou a fumar algum produto do tabaco diariamente?

1. Anos:.....
2. Não sabe/ Não lembra

36. Em média, quantos cigarros o Sr (a) fuma por dia?

Em média, quantos dos seguintes produtos 0 (a) Sr (a) fuma por dia ou por semana atualmente?

37. Cigarros industrializados?

1. Um ou mais por dia. Quantos por dia?.....
2. Menos que um por dia e mais que zero (0) por semana ou por mês
3. Não fuma
4. Não sabe

☐

38. Cigarros de palha ou enrolados a mão?

1. Um ou mais por dia. Quantos por dia?.....
2. Menos que um por dia e mais que zero (0) por semana ou por mês
3. Não fuma
4. Não sabe

☐

39. Cachimbo?

1. Um ou mais por dia. Quantos por dia?.....
2. Menos que um por dia e mais que zero (0) por semana ou por mês
3. Não fuma
4. Não sabe

☐

40. Charutos ou cigarrilhas?

1. Um ou mais por dia. Quantos por dia?.....
2. Menos que um por dia e mais que zero (0) por semana ou por mês
3. Não fuma
4. Não sabe

☐

41. Outros. Especifique.....

1. Um ou mais por dia. Quantos por dia?.....
2. Menos que um por dia e mais que zero (0) por semana ou por mês
3. Não fuma
4. Não sabe
5. Não se aplica

☐

USUÁRIO OCASIONAL DE TABACO FUMADO

Pense novamente em todos os tipos de produtos do tabaco que são fumados: cigarros e também charutos, cigarrilhas, cigarros indianos (ou bidis). Por favor, não responda sobre produtos de tabaco que não fazem fumaça, como rapé e fumo de mascar. Não considere também cigarros de maconha.

42. Durante os últimos trinta dias (último mês) em quantos dias o (a) Sr (a) fumou algum produto do tabaco?

1. Dias:.....
2. Não sabe/ Não lembra

☐

43. Que idade tinha quando o (a) Sr (a) começou a fumar algum produto do tabaco mesmo que de vez em quando?

1. Anos:.....
2. Não sabe/ Não lembra

☐

44. Há quantos anos o (a) Sr (a) começou a fumar algum produto do tabaco, mesmo que de vez em quando?

1. Anos:.....
2. Não sabe/ Não lembra

☐

45. Que idade tinha quando começou a fumar algum produto do tabaco diariamente?

1. Anos:.....
2. Não sabe/ Não lembra

☐

46. Em média, quantos cigarros o Sr fuma por semana?

Quantos dos seguintes produtos o (a) Sr (a) fuma por semana atualmente (Leia cada item)?

Caso o entrevistado responda que fumou nos últimos trinta dias, mas fumou menos de uma unidade por semana, assinale a opção menos que um por dia e mais que zero (0) por semana ou por mês.

47. Cigarros industrializados?

1. Um ou mais por dia. Quantos por dia?.....
2. Menos que um por dia e mais que zero (0) por semana ou por mês
3. Não fuma
4. Não sabe

☐

48. Cigarros de palha ou enrolados a mão?

1. Um ou mais por dia. Quantos por dia?.....
2. Menos que um por dia e mais que zero (0) por semana ou por mês
3. Não fuma
4. Não sabe

☐

49. Cachimbo?

1. Um ou mais por dia. Quantos por dia?.....
2. Menos que um por dia e mais que zero (0) por semana ou por mês
3. Não fuma
4. Não sabe

☐

50. Charutos ou cigarrilhas?

1. Um ou mais por dia. Quantos por dia?.....
2. Menos que um por dia e mais que zero (0) por semana ou por mês
3. Não fuma
4. Não sabe

51. Outros. Especifique.....

1. Um ou mais por dia. Quantos por dia?.....
2. Menos que um por dia e mais que zero (0) por semana ou por mês
3. Não fuma
4. Não sabe
5. Não se aplica

EX USUÁRIO DE TABACO FUMADO

Pense novamente em todos os tipos de produtos do tabaco que são fumados: cigarros e também charutos, cigarrilhas, cigarros de cravo (ou de Bali), cigarros indianos (ou bidis) e narguilé (ou cachimbo d'água). Por favor, não responda sobre produtos de tabaco que não fazem fumaça, como rapé e fumo de mascar. Não considere também cigarros de maconha.

52. Que idade tinha quando o (a) Sr (a) começou a fumar algum produto do tabaco mesmo que de vez em quando?

1. Anos:
2. Não sabe/ Não lembra

53. Há quantos anos o (a) Sr. (a) começou a fumar algum produto do tabaco mesmo que de vez em quando?

1. Anos:
2. Não sabe/ Não lembra

54. Que idade tinha quando o (a) Sr (a) começou a fumar algum produto do tabaco diariamente?

1. Anos:
2. Não sabe/ Não lembra

55. Em média, quantos cigarros o Sr (a) fumava por dia?

56. Há quanto tempo parou de fumar?

1. Anos
2. Meses
3. Semanas
4. Dias

57. CARGA TABÁGICA:

AUDIT (parcial)

Agora vou fazer algumas perguntas sobre seu consumo de álcool ao longo dos últimos 12 meses

58. Com que frequência você consome bebidas alcoólicas?

(1) Nunca [vá para as questões 9-10]

(2) Mensalmente ou menos

(3) De 2 a 4 vezes por mês

(4) De 2 a 3 vezes por semana

(5) 4 ou mais vezes por semana

59. Quantas doses alcoólicas você consome tipicamente ao beber?

.....

--	--

60. Com que frequência você consome cinco ou mais doses de uma vez?

(1) Nunca

(2) Menos do que uma vez ao mês

(3) Mensalmente

(4) Semanalmente

(5) Todos ou quase todas os dias

☐

61. O Sr. (a) está em tratamento regular para alguma doença?

1. Sim 2. Não

Qual doença?

☐
☐

62. HAS 1. Sim 2. Não 3. Não se aplica

63. O (A) Sr. (a) tem alergias na pele ou já teve crises de cansaço como na asma, nariz com secreção como ocorre na rinite alérgica, sinusite ou outras alergias?

1. Sim 2. Não 3. Não se aplica

☐

64. O (A) Sr. (a) tem Lúpus eritematoso, dermatomiosite, esclerodermia ou outra doença que ataca o próprio organismo, a chamada doença auto-imune?

1. Sim 2. Não 3. Não se aplica

☐

65. O (A) Sr. (a) tem diabetes mellitus, conhecido como açúcar no sangue?

1. Sim 2. Não 3. Não se aplica

☐

66. O (A) Sr. (a) tem alguma doença no coração?.....

1. Sim 2. Não 3. Não se aplica

☐

67. O (A) Sr. (a) tem bócio ou doença na tireóide como hipertireoidismo ou hipotireoidismo?.....

1. Sim 2. Não 3. Não se aplica

☐

68. O Sr (a) tem algum outro tipo de doença que eu não falei até agora?

1.Sim 2. Não 3. Não se aplica

Qual/quais _____

☐

69. O (A) Sr. (a) tem ou já teve câncer de pele? (Exclui controles)

1. Sim 2. Não 3. Não se aplica (controles)

☐

De qual tipo?

70. CBC : 1.SIM 2.NÃO 3.NA 4.SI

☐

71. CEC : 1.SIM 2.NÃO 3.NA 4.SI

☐

72. MM: 1.SIM 2.NÃO 3.NA 4.SI

☐

73. O Sr (a) toma regularmente – diariamente, semanal ou mensalmente algum tipo de medicação?

1. Sim 2. Não

☐

Qual/is medicações?

74. Antiipertensivo:

1. Sim 2. Não 3. Não se aplica

☐

75. Hipoglicemiante:

1. Sim 2. Não 3. Não se aplica

☐

76. Insulina:

1. Sim 2. Não 3. Não se aplica

☐

77. Corticóide:

1. Sim 2. Não 3. Não se aplica

☐

78. Antidepressivo:

1. Sim 2. Não 3. Não se aplica

☐

79. Ansiolítico:

1. Sim 2. Não 3. Não se aplica

☐

80. Antiinflamatório

1. Sim 2. Não 3. Não se aplica

☐

81. Outras medicações:.....

1. Sim 2. Não 3. Não se aplica

☐

82. Alguém da família já teve câncer de pele?

1. Sim 2. Não

☐

De qual tipo?

83. CBC : 1.SIM 2.NÃO 3.NA 4.SI

☐

84. CEC : 1.SIM 2.NÃO 3.NA 4.SI

☐

85. MM: 1.SIM 2.NÃO 3.NA 4.SI

☐

86. Qual é o seu peso – em Kilogramas?

87. Qual é a sua altura – em metros?

88. IMC =

89. Classificação IMC

☐

1. Menor que 18,5 = Baixo Peso
2. Entre 18,5 – 24,9 = Normal
3. Igual ou maior que 25 – 29,9 = Excesso de Peso
4. Igual ou maior que 30 = Obesidade

90. A pele de cada pessoa reage de forma diferente quando se expõe ao sol. O que acontece em sua pele quando o (a) Sr (a) se expõe ao sol? Vou ler algumas alterações que podem acontecer e apenas responda o que acontece com sua pele:

Categorias de Fitzpatrick:

- 1 – Queima com facilidade e nunca bronzeia? Muito sensível: Branca ruiva
- 2 – Geralmente queima, às vezes bronzeia? Branca: Sensível
- 3 – Sempre bronzeia e algumas vezes queima? Morena clara: Normal
- 4 – Queima pouco, bronzeia com facilidade? Morena moderada: Normal
- 5 - Queima raramente, bronzeia bastante? Morena escura: Pouco sensível
- 6 – Quase nunca ou nunca queima, totalmente pigmentada? Negra: Quase insensível

☐

91. Já teve queimadura por conta de exposição ao sol?

1. Sim
2. Não

☐

92. Quantas vezes teve queimaduras por conta dessa exposição?

1. 1vez
2. 2 vezes
3. 3 vezes
4. 4 ou mais vezes
- 9.NA

93. Já teve queimadura com formação de bolhas após exposição ao sol antes da idade entre 18 – 20 anos?

- 1.Sim
2. Não
3. NA

☐

94. Já teve queimaduras por quaisquer líquidos ou químicos como água, óleo, ácidos?

1. Nunca
2. 1 – 4 vezes
3. 5 ou mais vezes

☐

95. Essa queimadura deixou cicatriz?

1. Sim
2. Não
3. Não se aplica

☐

96. Qual o local da cicatriz?

1. Face, pescoço, colo e mãos
2. Membros e tronco
3. Mucosas
4. Outras regiões do corpo:
5. Não se aplica

☐

EXAME CLÍNICO

97. Diagnóstico clínico

1. Carcinoma Espinocelular
2. Carcinoma Espinocelular e Ceratose actínica
3. Carcinoma Espinocelular, Ceratose Actínica e Carcinoma basocelular
4. Carcinoma basocelular
5. Carcinoma Espinocelular, Ceratose actínica e Carcinoma basocelular e outras dermatoses não EV, não herpes simples recidivantes, não MH, não pitíriase versicolor (.....).
6. Outras dermatoses não EV, não herpes simples recidivantes, não MH, não pitíriase versicolor (.....) (Controles).
7. Ausência de dermatoses (controles)

☐

98. Presença de fotodano avaliada por elastose da nuca:

1. Ausência
2. Limitada
3. Moderada
4. Extensa

☐

99. Queratose actínica (Fator de exclusão para controles).

1. Sim
2. Não
3. Não se aplica (controles)

☐

100. Número de Lesões de Queratose actínica (Fator de exclusão para controles).

Nº:.....

1. Menor que 10
2. Igual ou maior que 10
3. Não se aplica (controles)

☐

101. CBC

1. Sim: quantos:.....
2. Não
3. Não se aplica (controles)

☐

102. CEC

1. Sim: quantos:.....
2. Não
3. Não se aplica (controles)

☐

103. Outras dermatoses

1. Sim: quais:.....
2. Não
3. Ausência (controles)

☐

LESÃO I

104. Localização da lesão (categorias de exposição):

- 1 – Categoria I: Exposição Intensa: Cabeça, pescoço e dorso das mãos.
- 2 – Categoria II: Exposição Moderada: Tronco e extremidades

☐

105. Tempo de lesão:

- 1. Semanas: quantas.....
- 2. Meses: quantos.....
- 3. Anos: quantos.....
- 4. Não se aplica (controles)

☐

DLT:

.....

.....

.....

.....

.....

.....

106. Dimensão da lesão

☐

EXAME DERMATOSCÓPICO: Alterações observadas:

107. Eritema

- 1. Sim
- 2. Não
- 3. Não se aplica

☐

108. Pseudo rede eritematosa

- 1. Sim
- 2. Não
- 3. Não se aplica

☐

109. Eritema estrelado (em explosão de estrelas)

- 1. Sim
- 2. Não
- 3. Não se aplica

☐

110. Vasos em pontilhado / aspecto glomerular

- 1. Sim
- 2. Não
- 3. Não se aplica

☐

111. Vasos em pino de cabelo (em grampo)

- 1. Sim
- 2. Não
- 3. Não se aplica

☐

112. Vasos lineares irregulares (disposição)

- 1. Sim
- 2. Não
- 3. Não se aplica

☐

113. Aspecto em alvo dos folículos pilosos

- 1. Sim
- 2. Não
- 3. Não se aplica

☐

114. Rosetas

☐

1. Sim 2. Não 3. Não se aplica

115. Áreas ou estruturas brancas

1. Sim 2. Não 3. Não se aplica

☐

116. Escamas opacas branco-amareladas

1. Sim 2. Não 3. Não se aplica

☐

117. Escamas discretas difusas

1. Sim 2. Não 3. Não se aplica

☐

118. Escamas centrais

1. Sim 2. Não 3. Não se aplica

☐

119. Microerosões/ulcerações

1. Sim 2. Não 3. Não se aplica

☐

120. Massa queratótica central

1. Sim 2. Não 3. Não se aplica

☐

121. Ulceração central

1. Sim 2. Não 3. Não se aplica

☐

122. Diagnóstico Dermatoscópico

1. Pseudo - rede eritematosa: **Queratose actínica**
2. Vasos pontilhados/glomerulares, escamas amarelas opacas difusas e microerosões: **CEC “in situ”**
3. Vasos lineares irregulares, folículos capilares, áreas targetoides, áreas sem estrutura branca, massa central de queratina, e ulceração: **CEC invasivo**

☐

RESULTADO DO EXAME HISTOPATOLÓGICO

123. CASO-ESPE C

- 1.CEC 2.QA 3.CBC

☐

124. Espessura do tumor:

1. Tumores de 2,0 mm menos em espessura
2. Tumores entre 2,1 e 6,0 mm em espessura
3. Tumores acima de 6,0 mm em espessura
4. Não se aplica

☐

125. Achados histopatológicos:

1. CEC “in situ”
2. CEC invasivo:
3. Queratose Actínica
4. CBC
5. Não se aplica (controles)

☐

126. Grau Histopatológico (G) da classificação de Broders

1. Grau não pode ser acessado
2. Mais que 75% das células bem diferenciadas: bem diferenciado
3. de 50 a 75% bem diferenciadas: moderadamente diferenciado
4. de 25 a 50% bem diferenciadas: mal diferenciado
5. Menos que 25% das células tumorais bem diferenciadas: indiferenciado
6. Não se aplica

☐

127. GRUPOS DE ESTADIAMENTO

1. Estadio 0
2. Estadio I: Tis N0 M0
3. Estadio II: T1 N0 M0
4. Estadio IIa: T2 N0 M0
5. Estadio IIb: T3 N0 M0
6. Estadio IIc: T4 N0 M0
7. Estadio III: Qualquer T N1 M0
8. Estadio IV: Qualquer T qualquer N M1
9. Não se aplica

☐

LESÃO II

EXAME CLÍNICO - DERMATOSCÓPICO – HISTOPATOLÓGICO

128. Localização da lesão (categorias de exposição):

- 1 – Categoria I: Exposição Intensa: Cabeça, pescoço e dorso das mãos.
- 2 – Categoria II: Exposição Moderada: Tronco e extremidades

☐

129. Tempo de lesão:

1. Semanas: quantas.....
2. Meses: quantos.....
3. Anos: quantos.....
4. Não se aplica (controles)

☐

DLT:

.....

.....

.....

.....

.....

130. Dimensão da lesão

--	--

EXAME DERMATOSCÓPICO: Alterações observadas:

131. Eritema

1. Sim 2. Não 3. Não se aplica

☐

132. Pseudo rede eritematosa

1. Sim 2. Não 3. Não se aplica

☐

133. Eritema estrelado (em explosão de estrelas)

1. Sim 2. Não 3. Não se aplica

☐

134. Vasos em pontilhado / aspecto glomerular

1. Sim 2. Não 3. Não se aplica

☐

135. Vasos em pino de cabelo (em grampo)

1. Sim 2. Não 3. Não se aplica

☐

136. Vasos lineares irregulares (disposição)

1. Sim 2. Não 3. Não se aplica

☐

137. Aspecto em alvo dos folículos pilosos

1. Sim 2. Não 3. Não se aplica

☐

138. Rosetas

1. Sim 2. Não 3. Não se aplica

☐**139. Áreas ou estruturas brancas**

1. Sim 2. Não 3. Não se aplica

☐**140. Escamas opacas branco-amareladas**

1. Sim 2. Não 3. Não se aplica

☐**141. Escamas discretas difusas**

1. Sim 2. Não 3. Não se aplica

☐**142. Escamas centrais**

1. Sim 2. Não 3. Não se aplica

☐**143. Microerosões/ulcerações**

1. Sim 2. Não 3. Não se aplica

☐**144. Massa queratótica central**

1. Sim 2. Não 3. Não se aplica

☐**145. Ulceração central**

1. Sim 2. Não 3. Não se aplica

☐**146. Diagnóstico Dermatoscópico**

1. Pseudo - rede eritematosa: **Queratose actínica**
 2. Vasos pontilhados/glomerulares, escamas amarelas opacas difusas e microerosões: **CEC “in situ”**
 3. Vasos lineares irregulares, folículos capilares, áreas targetoides, áreas sem estrutura branca, massa central de queratina, e ulceração: **CEC invasivo**
 4.

☐**RESULTADO DO EXAME HISTOPATOLÓGICO****147. CASO-ESPE C**

- 1.CEC 2.QA 3.CBC

☐**148. Espessura do tumor:**

1. Tumores de 2.0 mm menos em espessura

☐

2. Tumores entre 2,1 e 6,0 mm em espessura
3. Tumores acima de 6,0 mm em espessura
4. Não se aplica

149. Achados histopatológicos:

1. CEC “in situ”
2. CEC invasivo:
3. Queratose Actínica
4. CBC
5. Não se aplica (controles)

☐

150. Grau Histopatológico (G) da classificação de Broders

1. Grau não pode ser acessado
2. Mais que 75% das células bem diferenciadas: bem diferenciado
3. de 50 a 75% bem diferenciadas: moderadamente diferenciado
4. de 25 a 50% bem diferenciadas: mal diferenciado
5. Menos que 25% das células tumorais bem diferenciadas: indiferenciado
6. Não se aplica

☐

151. GRUPOS DE ESTADIAMENTO

1. Estadio 0
2. Estadio I: Tis N0 M0
3. Estadio II: T1 N0 M0
4. Estadio IIa: T2 N0 M0
5. Estadio IIb: T3 N0 M0
6. Estadio IIc: T4 N0 M0
7. Estadio III: Qualquer T N1 M0
8. Estadio IV: Qualquer T qualquer N M1
9. Não se aplica

☐

LESÃO III

EXAME CLÍNICO - DERMATOSCÓPICO – HISTOPATOLÓGICO

152. Localização da lesão (categorias de exposição):

- 1 – Categoria I: Exposição Intensa: Cabeça, pescoço e dorso das mãos.
- 2 – Categoria II: Exposição Moderada: Tronco e extremidades

☐

153. Tempo de lesão:

1. Semanas: quantas.....
2. Meses: quantos.....
3. Anos: quantos.....
4. Não se aplica (controles)

☐

DLT:

.....

.....

.....

.....

☐

154. Dimensão da lesão

☐

EXAME DERMATOSCÓPICO: Alterações observadas:

155. Eritema

1. Sim 2. Não 3. Não se aplica

☐

156. Pseudo rede eritematosa

1. Sim 2. Não 3. Não se aplica

☐

157. Eritema estrelado (em explosão de estrelas)

1. Sim 2. Não 3. Não se aplica

☐

158. Vasos em pontilhado / aspecto glomerular

1. Sim 2. Não 3. Não se aplica

☐

159. Vasos em pino de cabelo (em grampo)

1. Sim 2. Não 3. Não se aplica

☐

160. Vasos lineares irregulares (disposição)

1. Sim 2. Não 3. Não se aplica

☐

161. Aspecto em alvo dos folículos pilosos

1. Sim 2. Não 3. Não se aplica

☐

162. Rosetas

1. Sim 2. Não 3. Não se aplica

☐

163. Áreas ou estruturas brancas

2. Sim 2. Não 3. Não se aplica

☐

164. Escamas opacas branco-amareladas

1. Sim 2. Não 3. Não se aplica

☐

165. Escamas discretas difusas

1. Sim 2. Não 3. Não se aplica

☐

166. Escamas centrais

1. Sim 2. Não 3. Não se aplica

☐

167. Microerosões/ulcerações

1. Sim 2. Não 3. Não se aplica

☐

168. Massa queratótica central

1. Sim 2. Não 3. Não se aplica

☐

169. Ulceração central

1. Sim 2. Não 3. Não se aplica

☐

170. Diagnóstico Dermatoscópico

1. Pseudo - rede eritematosa: **Queratose actínica**
 2. Vasos pontilhados/glomerulares, escamas amarelas opacas difusas e microerosões: **CEC “in situ”**
 3. Vasos lineares irregulares, folículos capilares, áreas targetoides, áreas sem estrutura branca, massa central de queratina, e ulceração: **CEC invasivo**

☐

RESULTADO DO EXAME HISTOPATOLÓGICO

171. CASO-ESPE C

- 1.CEC 2.QA 3.CBC

☐

172. Espessura do tumor:

1. Tumores de 2.0 mm menos em espessura
 2. Tumores entre 2,1 e 6,0 mm em espessura

☐

3. Tumores acima de 6,0 mm em espessura
4. Não se aplica

173. Achados histopatológicos:

1. CEC “in situ”
2. CEC invasivo:
3. Queratose Actínica
4. CBC
5. Não se aplica (controles)

☐

174. Grau Histopatológico (G) da classificação de Broders

1. Grau não pode ser acessado
2. Mais que 75% das células bem diferenciadas: bem diferenciado
3. de 50 a 75% bem diferenciadas: moderadamente diferenciado
4. de 25 a 50% bem diferenciadas: mal diferenciado
5. Menos que 25% das células tumorais bem diferenciadas: indiferenciado
6. Não se aplica

☐

175. GRUPOS DE ESTADIAMENTO

1. Estadio 0
2. Estadio I: Tis N0 M0
3. Estadio II: T1 N0 M0
4. Estadio IIa: T2 N0 M0
5. Estadio IIb: T3 N0 M0
6. Estadio IIc: T4 N0 M0
7. Estadio III: Qualquer T N1 M0
8. Estadio IV: Qualquer T qualquer N M1
9. Não se aplica

☐

Determinação da DEM/2 x DEM/UVB-S/UVB-R:

176. EXPOSIÇÃO À UVB-NARROW BAND POR 24 MINUTOS:

1. Sim
2. Não (Não realizou o teste de UVB-S)

Irradiar cada quadrado de pele de 2 x 2 cm, a 2,5 cm de distância

Leitura 24 h após irradiação

A DEM é a dose correspondente ao menor tempo de exposição que apresentou o eritema mais com limites bem definidos

☐

leve

KJ / kj/m2	Seg	Seg	KJ / kj/m2
3	120	180	4,5
6	240	360	9
12	480	720	18
24	960	1440	36

177. II FASE: Após 24 horas, identificar a Dose Eritematosa Mínima

--	--

178. Exposição à Difenciprona 0,05 % em 2 x a DEM onde aplica-se o contactante Difenciprona, apenas na área irradiada e veda-se como num teste de contato.

--	--

179. Após 48 h realiza-se a leitura para observação do efeito irritante/sensibilizante primário:

1. Sim
2. Não

--

180. Verificar se houve sensibilização mediada imunologicamente ao DPCB: 21 a 28 dias após a irradiação aplica-se o DPCB a 0,001% em área não irradiada do dorso e após 48 h lê-se o resultado:

(Aguardar 30' (meia hora) após a retirada do esparadrapo):
 Marcar um dos critérios de interpretação e leitura do teste:

1. (-) Reação negativa
2. (+) Reação fraca: eritema discreto, pouca infiltração, sem vesículas.
3. (++) Reação forte: eritema moderado, pápulas ocasionais, poucas vesículas.
4. (+++) Reação muito forte: eritema forte, edema e muitas vesículas.
5. (++++) Reação extrema: formação de bolhas e ulceração.

--

181. Classificação em UVB-S ou UVB-R:

1. Reação Negativa = não reatores: considerados **UVBSuscetíveis (UVB-S)**;
2. Reação Positiva = reatores: **UVB-resistentes (UVB-R)**.

--

EXTRAÇÃO DO DNA PARA DETECÇÃO DO HPV-BETA:

182. Para a extração do DNA será utilizando o kit: QIAampDNA Mini kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany).

1. Presença do HPV-DNABeta/EV-5 e 8
2. Ausência do HPV-DNABeta/EV-5 e 8
3. Não pesquisado

--

RESULTADOS RTL-9