



FACULDADE DE MEDICINA  
UNIVERSIDADE DE  
**COIMBRA**

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA – TRABALHO FINAL

JOANA BÁRBARA GASPAR DOMINGOS

***Carcinoma espinhocelular cutâneo: Novos fatores de risco***

ARTIGO DE REVISÃO

ÁREA CIENTÍFICA DE DERMATOLOGIA

Trabalho realizado sob a orientação de:  
RICARDO JOSÉ DAVID COSTA VIEIRA, PROFESSOR DOUTOR

FEVEREIRO/2022



**Artigo de revisão**

**Título:** *Carcinoma espinhocelular cutâneo: Novos fatores de risco*

**Autor:** Joana Bárbara Gaspar Domingos<sup>1</sup>

**Orientador:** Ricardo José David Costa Vieira<sup>2</sup>

**Afiliação:**

<sup>1</sup>Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, Portugal; Endereço de correio eletrónico: jbgdomingos@gmail.com

<sup>2</sup>Serviço de Dermatologia, Centro hospitalar da Univerdade de Coimbra, Portugal; Endereço de correio eletrónico: ricardo.jdc.vieira@gmail.com; Morada: Azinhaga de Santa Comba, Celas, 3000 – 548 Coimbra



## Índice

<b>Resumo .....</b>	<b>7</b>
<b>Palavras-chave .....</b>	<b>7</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>8</b>
<b>Glossário de abreviaturas .....</b>	<b>9</b>
<b>1 Introdução .....</b>	<b>10</b>
<b>2 Materiais e métodos .....</b>	<b>11</b>
<b>3 Desenvolvimento .....</b>	<b>12</b>
3.1 Terapêutica clássica do CEC .....	12
3.1.1 Cirurgia .....	12
3.1.2 Radioterapia .....	12
3.2 Marcadores histológicos de recidiva do CEC .....	13
3.2.1 Invasão perineural .....	13
3.2.2 <i>Tumor budding</i> .....	16
3.2.3 Fibrose peritumoral .....	18
3.2.4 Metástases para os tecidos moles e invasão extra-ganglionar .....	18
3.3 Marcadores moleculares de recidiva do CEC .....	19
3.3.1 PD-L1 .....	19
3.3.2 RAS e p53 .....	21
3.3.3 Promotor da transcriptase reversa da telomerase .....	21
3.3.4 Podoplanina .....	22
3.3.5 Transcriptase da lectina-like 1 .....	23
3.3.6 Claudina 11 .....	23

3.3.7	Inositol-1,4,5-trisfosfato 5-fosfatase do tipo I.....	23
3.3.8	Pre-mRNA processing factor 3 .....	25
3.3.9	Antigénio A12 associado ao melanoma e p21 .....	25
3.4	Novas terapêuticas em estudo para o CEC e o seu impacto no futuro .....	26
3.4.1	Inibidores do recetor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) .....	26
3.4.2	Anticorpos anti ligando da proteína de morte celular programada – 1 .....	27
<b>4</b>	<b>Resultados .....</b>	<b>30</b>
<b>5</b>	<b>Discussão e conclusão .....</b>	<b>35</b>
<b>6</b>	<b>Agradecimentos .....</b>	<b>37</b>
<b>7</b>	<b>Referências bibliográficas .....</b>	<b>38</b>
<b>Índice de Tabelas</b>		
	<b>Tabela 1 .....</b>	<b>14</b>

## Resumo

**Introdução:** O carcinoma espinhocelular cutâneo é o segundo tumor cutâneo maligno mais frequente e a sua incidência tem sido crescente. Embora a maioria destes tumores apresentem um bom prognóstico, há uma pequena percentagem que evidencia maiores taxas de recorrência, invasão linfática, metástases locais e à distância e morte.

**Objetivos:** Estudar novos fatores de risco (invasão perineural, *tumor budding*, fibrose peritumoral, metástases para os tecidos moles e invasão extraganglionar, expressão do ligando da proteína de morte celular programada – 1, RAS e p53, o gene promotor da transcriptase reversa da telomerase, podoplanina, a transcriptase da lectina-like 1, a claudina 11, o inositol-1,4,5-trifosfato do tipo I, *pre-mRNA processing factor 3* e o antigénio 12 associado ao melanoma e p21) e avaliar possíveis implicações no prognóstico e a sua influência sobre a utilização de novas abordagens terapêuticas dirigidas (inibidores do recetor do fator de crescimento epitelial e anticorpos anti-ligando da proteína de morte celular programada – 1).

**Materiais e métodos:** Foram consultadas 43 referências bibliográficas obtidas na base de dados da PubMed.

**Conclusão:** Os novos fatores de risco estudados ao longo deste artigo de revisão evidenciaram ter impacto sobre a sobrevivência livre de doença e sobrevivência global dos doentes, pelo que é relevante a identificação de fatores que possam influenciar o estadiamento destes tumores e que possam ser utilizados como alvos moleculares para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas.

**Palavras-chave:** Carcinoma espinhocelular cutâneo, Fator de prognóstico; Recorrência; Metastático.

## **Abstract**

**Background:** Cutaneous squamous cell carcinoma is the second most frequent cutaneous malignant tumor and its incidence has been rising. Despite most of those tumors having a good prognosis, there are a small percentage that shows higher recurrence rates, lymphatic invasion, local and distant metastases and death.

**Objectives:** To assess new risk factors (perineural invasion, tumor budding, peritumoral fibrosis, soft tissue metastases and extra-nodal extension, programmed cell-death ligand – 1 expression, RAS and p53, promoter of the telomerase reverse transcriptase, podoplanin, lectin-like transcript 1, claudin 11, inositol polyphosphate-5-phosphatase, pre-mRNA processing factor 3 and melanoma-associated antigen A12 and p21) and understand the possible implications on prognosis and their influence in the management of new direct therapeutic approaches (inhibitors of the epidermal growth factor receptor and inhibitors of the programmed cell-death ligand – 1).

**Methods:** Were consulted 43 bibliographic references obtained from PubMed database.

**Conclusion:** The new risk factors studied throughout this literature review showed impact on the disease-free survival and overall survival of patients, whereby is relevant the continuance of the assessment of these risk factors to achieve a better staging system and also to define new molecular targets for the development of new therapeutic approaches.

**Keywords:** Cutaneous squamous cell carcinoma; Prognostic factor; Recurrence; Metastatic.



## **Glossário de abreviaturas**

CEC – Carcinoma espinhocelular cutâneo

UV – Ultravioleta

IPN – Invasão perineural

MTM – Metástases para os tecidos moles

IEG – Invasão extraganglionar

PD-L1 – Ligando da proteína de morte celular programada – 1

PD-1 – Proteína de morte celular programada – 1

TERTp – Promotor da transcriptase reversa da telomerase

LLT1 – Transcriptase da lectina-like 1

CLDN 11 – Claudina 11

INPP5A – Inositol-1,4,5-trisfosfato 5-fosfatase do tipo I

PRP3 – *Pre-mRNA processing factor 3*

MAGEA12 – Antígeno A12 associado ao melanoma

NCCN – *National Comprehensive Cancer Network*

IPNi – Invasão perineural incidental/microscópica

IPNc – Invasão perineural clínica

OS – Sobrevivência global

DFS – Sobrevivência livre de doença

RTa – Radioterapia adjuvante

QRT – Quimioradioterapia

LAG-3 – Gene de ativação de linfócitos 3

MAPKs – Proteínas cinases ativadas por mitogénio

NK – *Natural Killer*

QA – Queratose actínica

QS – Queratose seborreica

EGFR – Inibidores do receptor do factor de crescimento epitelial

$\alpha$ -Gal –  $\alpha$ -1,3, Galactose

## 1 Introdução

O carcinoma espinhocelular cutâneo (CEC) é o segundo tumor cutâneo maligno mais frequente, a seguir ao carcinoma basocelular. A sua incidência tem vindo a aumentar nas últimas décadas, graças ao diagnóstico mais precoce e a uma maior exposição à radiação ultravioleta (UV). [1,2] Prevê-se uma duplicação da incidência até 2030. [1]

Embora a maioria dos carcinomas espinhocelulares cutâneos tenham um bom prognóstico, há uma pequena percentagem que apresenta maiores taxas de recorrência, invasão linfática e, conseqüentemente, morte, [3] sendo o segundo carcinoma cutâneo com maior taxa de mortalidade, a seguir ao melanoma. [1]

Os principais fatores de risco que já foram amplamente estudados são o tamanho do tumor ( $\geq 2$  cm); espessura e profundidade de invasão ( $> 6$  mm); exposição à radiação UV; localização no lábio inferior, orelha e genitais; cicatrizes de queimadura; invasão linfovascular; doentes imunodeprimidos; baixa diferenciação histológica e ainda subtipos como o desmoplástico, acantolítico e doença de Bowen invasiva. [3,4] Para poder fazer uma estratificação prognóstica adequada e desenvolver novas terapêuticas dirigidas é fulcral o estudo de novos fatores de risco, tanto histológicos como moleculares. Dentro dos marcadores histológicos encontram-se a invasão perineural (IPN); [6-14] *tumor budding*; [15-17] fibrose peritumoral; [18] metástases para os tecidos moles (MTM) e invasão extraganglionar (IEG). [19] Nos marcadores moleculares destacam-se o ligando da proteína de morte celular programada – 1 (PD-L1); [20-24] RAS e p53; [25] o gene promotor da transcriptase reversa da telomerase (TERTp); [26] podoplanina; [27] a transcriptase da lectina-like 1 (LLT1); [28] a claudina 11 (CLDN 11); [29] o inositol-1,4,5-trisfosfato 5-fosfatase do tipo I (INPP5A); [30,31] *pre-mRNA processing factor 3* (PRP3) [32] e o antígeno A12 associado ao melanoma (MAGEA12) e p21. [33]

Com este artigo de revisão pretendemos analisar a evidência científica mais recente relativa aos novos fatores de risco do carcinoma espinhocelular cutâneo, perceber quais as possíveis implicações no prognóstico e a sua influência sobre a utilização de novas abordagens terapêuticas dirigidas.

## 2 Materiais e métodos

Para a realização deste artigo de revisão foram pesquisados artigos científicos, artigos de revisão, estudos de caso e diretrizes escritos em inglês e relativos à espécie humana, obtidos na base de dados da PubMed, e publicados entre 2016 e 2021, utilizando as seguintes palavras-chave: “Cutaneous squamous cell carcinoma”, “Prognostic factor”, “Recurrence” e “Metastatic”. Foram ainda consideradas outras publicações de interesse presentes nas listas de referências dos artigos selecionados. Entre os artigos encontrados, foram selecionados consoante o *abstract* aqueles com maior relevância para o tema proposto, num número total de 43 referências bibliográficas.

### **3 Desenvolvimento**

#### **3.1 Terapêutica clássica do CEC**

##### **3.1.1 Cirurgia**

A cirurgia é a terapêutica de escolha para os carcinomas espinhocelulares cutâneos tendo como principais objetivos a obtenção de margens livres, sem déficit de função ou alteração estética. [5] Nos tumores de baixo risco metastático deve realizar-se resseção cirúrgica com margem de 5 mm e nos tumores de alto risco metastático a resseção cirúrgica deve atingir os 10 mm de margem. [2,3,5] Quando é possível deve realizar-se uma resseção a 1 tempo, mas, se for necessário proceder a reconstrução com enxerto ou retalho, deve optar-se por uma resseção a 2 tempos, procurando reconstruir após comprovação de margens histológicas livres, embora a reconstrução possa ser segura se realizada imediatamente após cirurgia micrográfica de Mohs. [2]

Em doentes mais idosos, com tumores pequenos, bem diferenciados, com crescimento lento e em zonas expostas à radiação UV, a realização apenas de curetagem e eletrocoagulação é uma alternativa terapêutica a discutir, visto que a taxa de recorrência nestes casos é relativamente semelhante, independentemente de se realizar curetagem, resseção cirúrgica ou cirurgia de Mohs. [2,3] Pode ainda recorrer-se a esta técnica caso o doente não seja candidato a cirurgia. [3]

Em tumores de alto risco ou com localizações anatómicas de difícil manipulação deve optar-se pela cirurgia de Mohs. [2,3] Esta permite atingir uma taxa de cura aos 5 anos de 96,9% em oposição à excisão clássica (92,1%). [3]

##### **3.1.2 Radioterapia**

A radioterapia é uma alternativa à resseção primária quando esta não é possível por difícil execução; potenciais danos funcionais ou estéticos; [2,3,5] perante invasão perineural; [2] envolvimento linfovascular; doença avançada (T3-4); imunossupressão; doente que recusa a abordagem cirúrgica ou necessita de cuidados paliativos. [5]

O risco de recorrência após radioterapia isolada é superior quando comparado com a resseção cirúrgica. [2] Ainda assim, esta pode atingir ótimos resultados em carcinomas cutâneos espinhocelulares superficiais. [5]

Uma revisão sistemática realizada por *Jambusaria-Pahlajani et al.* concluiu que, quando se atingem margens livres, a radioterapia adjuvante não tem qualquer benefício. Porém, a

*National Comprehensive Cancer Network (NCCN)* recomenda a realização desta em quase todos os tumores ressecados localmente e a todos os tumores com invasão linfovascular. A exceção são os tumores solitários com < 3 cm em que é suficiente a resseção cirúrgica isolada. [3,5]

Alguns efeitos adversos da radioterapia são a atrofia cutânea; alopecia; hiposudorese; diminuição da secreção sebácea; discromia; telangiectasias; esclerose hipodérmica e aparecimento tardio de novos tumores cutâneos, pelo que deve ser evitada em doentes jovens. [2]

Após a terapêutica, o doente deve ser seguido periodicamente. Nos tumores de alto risco, tendo em conta que a maioria recorre nos primeiros 2 anos, [2] este seguimento deve ser realizado a cada 3 – 6 meses, durante 5 anos, com palpação da zona de excisão tumoral e da região linfática. [2,3] Para além desta avaliação local deve ainda ser realizada uma avaliação de toda a pele do doente a cada 6 meses ou anualmente. Doentes idosos com tumores pequenos, bem diferenciados e em zonas de exposição à radiação UV podem ter alta após 3 meses de seguimento. [2]

## **3.2 Marcadores histológicos de recidiva do CEC**

### **3.2.1 Invasão perineural**

A invasão perineural é definida como a “propagação de células tumorais para o espaço que envolve um nervo”. [6]

1 – 5% de todos os CEC apresentam IPN, particularmente aqueles que surgiram na sequência de exposição à radiação UV. [7] Se considerarmos características específicas relacionadas com uma maior prevalência de IPN observamos que 64% dos CECs com tamanho  $\geq 2,5$  cm têm IPN, ao passo que só encontramos IPN em 11% dos tumores com tamanho <2,5 cm. [6] Para além do tamanho do tumor, há outros fatores que tornam a IPN mais prevalente, como o sexo masculino; tumores recorrentes; localização à região central do rosto; baixa diferenciação histológica e profundidade de invasão. [8] Se nenhum destes fatores estiver presente, a presença de IPN não indica um pior prognóstico. [8]

A invasão perineural pode ser de 2 tipos: incidental/microscópica (IPNi) ou clínica (IPNc). Na IPNi o doente não apresenta sintomas nem alterações aos exames de imagem, sendo o seu diagnóstico um achado incidental, muitas vezes aquando da avaliação pela anatomia patológica da peça cirúrgica. [6-8] Representa 60 – 70% dos doentes diagnosticados com invasão perineural [6,8]. Por outro lado, na IPNc, os doentes manifestam sintomas. [6-8] Como

sintomas iniciais podem apresentar parestesias com evolução para dor, anestesia ou paralisia e podemos encontrar evidência de invasão perineural nos exames de imagem. [6,8,13] Estes doentes representam 30 – 40% dos doentes com invasão perineural. [6,8] *Clayman et al.* descobriu que a sobrevivência global (OS) aos 3 anos de doentes com CEC com IPN é de 64% enquanto a de doentes com CEC sem IPN é de 91%. Uma revisão sistemática recente baseada em 12 estudos com um total de 640 casos de CEC com IPN concluiu que não há diferenças no risco de metástases ganglionares e à distância entre doentes com IPNi e IPNc. [6] Noutra revisão sistemática que incluiu 6 estudos com 241 doentes com IPNc e 7 estudos com 381 doentes com IPNi observou-se que o risco de metástases ganglionares foi de 6% na IPNc e de 10% na IPNi; o risco de metástases à distância foi de 0.5% na IPNc e de 3% na IPNi; as mortes provocadas pela doença corresponderam a 27% na IPNc e a 6% na IPNi; a sobrevivência livre de doença (DFS) aos 5 anos foi de 61% na IPNc e de 76% na IPNi; a sobrevivência global aos 5 anos foi de 66% na IPNc e de 43% na IPNi. Conclui-se que doentes com IPNc têm maior risco de recorrência local e mortalidade, mas melhor sobrevivência global aos 5 anos, comparativamente com doentes com IPNi. [8]

**Tabela 1:** Resultados expectados na IPNc e IPNi

	IPNc	IPNi
Taxa de recorrência local	37%	17%
Risco de metástases ganglionares	6%	10%
Risco de metástases à distância	0.5%	3%
Mortes provocadas pela doença	27%	6%
Sobrevivência livre de doença aos 5 anos	61%	76%
Sobrevivência global aos 5 anos	66%	43%

Na invasão perineural, os principais nervos afetados são o nervo trigêmeo e o nervo facial, [6] sendo o melhor exame de imagem para avaliar a presença de invasão perineural a Ressonância Magnética. [6,7] *Williams et al.* criou um sistema de classificação para avaliar o nível de invasão perineural destes 2 nervos na Ressonância Magnética. Nessa classificação encontramos 3 zonas: 1 – Periférica; 2 – Central/ Base do crânio; 3 – Cisterna. Esta classificação é de extrema relevância para a avaliação do prognóstico do doente, sendo a sobrevivência global aos 5 anos dos doentes com invasão da zona 1, 2 e 3 é de 85,7%, 64,4% e 20%, respetivamente. [6]

*Haug et al.* realizou um estudo com 1399 doentes, com o objetivo de determinar o impacto prognóstico da invasão perineural no CEC. Após concluir que a invasão perineural apenas se encontrava em tumores desmoplásicos, criou 3 subgrupos de tumores – tumores sem

desmoplasia; tumores com desmoplasia, sem IPN e tumores com desmoplasia e IPN. [9,10] A desmoplasia é caracterizada, histologicamente, pela presença de tecido conjuntivo fibroso à volta do tumor, com células tumorais com crescimento trabecular. [10] Após esta divisão observou que o surgimento de metástases e a maior taxa de recorrência foram encontradas nos tumores com desmoplasia e IPN (71,4%), seguida dos tumores com desmoplasia, mas sem IPN (35,2%) e, por fim, os tumores sem desmoplasia (7,2%). A sobrevivência aos 5 anos foi de 17%, 50% e 89%, respetivamente. Observou ainda que doentes imunodeprimidos apresentavam uma maior taxa de tumores desmoplásicos e de IPN. [9]

*K. Khan et al.* desenvolveu um estudo com 598 CEC para avaliar as taxas de recorrência local e de metástases ganglionares. Obteve uma taxa de recorrência aos 5 anos de 6,7%. Destes, 96% recorreram dentro dos primeiros dois anos após o tratamento. Além disso, 19,1% dos doentes com IPN apresentaram recorrência local, ao passo que dos doentes sem IPN apenas 5,6% apresentaram recorrência. [11]

Relativamente ao tratamento de tumores com invasão perineural, a cirurgia de Mohs é a principal abordagem terapêutica. *Rowe et al.* reportou uma taxa de recorrência de 47% quando se optava por uma cirurgia *standard*, enquanto com a cirurgia de Mohs reportou uma taxa de recorrência de 0%. *Cottel* reportou também 0 casos de recorrência local 42 meses após a cirurgia de Mohs e apenas 1 caso de metástases. *Leibovitch et al.*, por outro lado, reportou uma taxa de recorrência aos 5 anos de 8%. Nos casos em que a IPN envolve pequenos nervos cutâneos, com um diâmetro <0,1 mm, o seguimento pode ser apenas clínico, porém, se o diâmetro for ≥0,1 mm deve realizar-se radioterapia adjuvante (RTa). [6,13,14]

*Trosman et al.* realizou um estudo com 104 doentes onde foram aplicadas diversas terapêuticas – cirurgia isoladamente, cirurgia com radioterapia adjuvante e cirurgia com quimiorradioterapia (QRT). 61% dos tumores apresentavam IPN. A sobrevivência livre de doença aos 2 anos para a cirurgia isoladamente, cirurgia com radioterapia adjuvante e cirurgia com quimiorradioterapia foi de 71%, 65% e 58%, respetivamente. Foram obtidos estes resultados porque, quanto mais avançada a doença, mais agressivo o tratamento, logo eram doentes que desde início apresentavam pior prognóstico. De seguida, os doentes foram divididos em 2 grupos – os que tinham doença primária e os que tinham doença recorrente. Na doença primária obteve-se uma sobrevivência livre de doença aos 2 anos para a cirurgia isoladamente, cirurgia com RTa e cirurgia com QRT de 60%, 79% e 82%, respetivamente. No grupo de doentes com doença recorrente obteve-se uma sobrevivência livre de doença aos 2 anos para a cirurgia isoladamente, cirurgia com RTa e cirurgia com QRT de 75%, 53% e 47%, respetivamente. Globalmente, a sobrevivência livre de doença aos 2 anos após cirurgia foi de

71%, após cirurgia e RTa foi de 65% e após cirurgia e QRT foi de 58%. Este estudo permitiu concluir que não há benefício na associação de quimioterapia à radioterapia para prevenir a recorrência da doença. [12]

*Hazim et al.* procedeu a um estudo com 21 doentes em que foram realizados 2 tipos de tratamento – radioterapia com fotões e radioterapia com protões. 67% dos doentes realizaram ainda quimioterapia. A sobrevivência livre de doença foi de 21,5 meses, a taxa de recorrência local foi de 40,8%, a sobrevivência global aos 2 anos foi de 85% e metástases à distância foram incomuns. A utilização de radioterapia com protões permitiu tratar os doentes com intuito de preservação de órgãos como o globo ocular. Concluiu-se que o tratamento com QRT tem bons resultados, embora muitos dos doentes apresentem recorrência local. [7]

*Cañueto et al.* realizou um estudo com 110 doentes com IPN, em que 12 apresentavam IPNc e os restantes 98 IPNi. Os doentes foram sujeitos a cirurgia de Mohs seguida de RTa, onde se concluiu que a realização desta é benéfica, em contraste com uma atitude expectante quando o diâmetro do nervo envolvido é  $\geq 0,1$  mm. A última levou a que os riscos de eventos adversos relacionados com a doença a longo prazo fossem quatro vezes superiores àquelas que realizaram RTa. Para além disto, a realização de RTa é especialmente benéfica quando, após a cirurgia de Mohs, as margens são positivas, não apresentando grande benefício quando estas são negativas. Porém, é recomendada a utilização de RTa independente da positividade das margens. [14]

Após o tratamento o doente deve ser monitorizado. Considerando que os primeiros 2 anos são os anos com maior taxa de recorrência, deve realizar-se uma avaliação de rotina detalhada dos nervos trigémeo e facial, assim como a motilidade ocular. Simultaneamente, deve ainda realizar-se uma Ressonância Magnética duas vezes por ano. [6]

### **3.2.2 Tumor budding**

*Tumor budding* é o processo através do qual células neoplásicas isoladas ou pequenos grupos de células neoplásicas se separam do tumor principal e infiltram o tecido conjuntivo envolvente. [15-17] O número máximo de células neoplásicas que podem constituir o pequeno grupo de células ainda não é consensual; *Karayannopoulou et al.* considera que podemos ter até 5 células, [15] mas já *Gonzalez-Guerrero et al.* e *Fujimoto et al.* consideram que podemos ter apenas até 4 células neoplásicas a formar um grupo. [16,17]

*Karayannopoulou et al.* desenvolveu um estudo com 25 casos de CEC agressivos e 27 casos de CEC não agressivos. Dividiu os tumores consoante o seu grau de *tumor budding* em 2 grupos – os com  $\geq 0.8$ /campo de grande ampliação e os com  $< 0.8$ /campo de grande



ampliação. O grupo de *tumor budding* com  $<0.8$ /campo de grande ampliação foi preditivo de CEC não agressivo, enquanto valores mais elevados apresentaram maior risco de CEC agressivo. Observou-se que *tumor budding* está positivamente relacionado com invasão linfovascular, sendo um fator de prognóstico independente nesta (93% dos CEC com metástases ganglionares apresentavam *tumor budding* ao passo que nos tumores sem metástases ganglionares, apenas 26% apresentavam *tumor budding*). Está ainda positivamente relacionado com a recorrência; metástases ganglionares e à distância; baixa sobrevivência livre de doenças e baixa sobrevivência global. Concluiu-se que este é um fator independente de pior prognóstico no CEC, sendo que tumores agressivos apresentam valores de *tumor budding* mais elevados que tumores não agressivos. [15]

*Gonzalez-Guerrero et al.* realizou um estudo com 49 tumores metastizados e 49 tumores não metastizados, tendo-os dividido em dois grupos segundo a presença ou ausência de células neoplásicas separadas do tumor principal. Tendo por base um estudo realizado por *Wang et al.*, classificou o *tumor budding* quanto à sua intensidade em baixa ( $<5$  grupos de células tumorais separadas do tumor principal) e alta ( $\geq 5$  grupos de células tumorais separadas do tumor principal). *Tumor budding* foi observado em 45 casos onde 20 destes foram de alta intensidade. A sobrevivência global dos tumores *com tumor budding* foi de 45% enquanto a dos tumores *sem tumor budding* foi de 95%. Para além disto, os tumores que evidenciavam células neoplásicas separadas do tumor principal apresentaram uma sobrevivência global inferior em comparação com os tumores que não apresentaram estas células. Observou-se que *tumor budding* é um fator de prognóstico importante apenas até à ocorrência de metástases ganglionares (as metástases ganglionares foram encontradas em 20% dos doentes *sem tumor budding* e em 85% dos tumores *com tumor budding*). A partir do momento em que estas estão presentes, o risco de morte não se altera independentemente da presença, ausência ou intensidade de *tumor budding*. [16]

*Fujimoto et al.* levou a cabo um estudo com 24 tumores metastizados e 24 tumores não metastizados, todos com tamanho  $<4$  cm. Dividiu-os em 3 graus consoante o número de grupos de células neoplásicas separados do tumor principal – grau 1: 0 a 4; grau 2: 5 a 9; grau 3:  $\geq 10$ . Os graus 2 e 3 eram considerados como *tumor budding* positivos, enquanto o grau 1 como *tumor budding* negativo. Observou-se que *tumor budding* está associado a alto risco de metástases ganglionares, recorrência e evidencia valor prognóstico. Independentemente do *tumor budding*, o número médio de células neoplásicas separadas do tumor principal em tumores metastizados e em tumores não metastizados foi de 9,5 e 3, respetivamente. A densidade destes grupos de células neoplásicas foi maior na área intratumoral do que na região peritumoral em 20,8% dos tumores, tendo-se concluído que,

muito provavelmente, na presença de *tumor budding* intratumoral este também estará presente na região peritumoral. Relativamente à presença de metástases, estas aumentaram à medida que o grau de *tumor budding* também aumentou (21,1% no grau 1, 61,5% no grau 2 e 75% no grau 3). Adicionalmente, estes tumores foram estudados quanto à presença de desmoplasia, onde se constatou que 87,5% destes apresentavam *tumor budding*. Neste estudo, tumores grau 3 evidenciaram pior sobrevivência livre de doença. Em suma, concluiu-se que o *tumor budding* está significativamente associado a metástases e mau prognóstico clínico em CEC com <4 cm. [17]

### **3.2.3 Fibrose peritumoral**

Para avaliar o valor prognóstico de tumores com fibrose peritumoral, *E. Hernández-Ruiz et al.* realizou um estudo com 102 doentes onde dividiu os tumores em 3 subgrupos consoante a sua componente fibrótica – madura, intermédia ou imatura. O subgrupo com componente fibrótica imatura foi caracterizado pela presença de alterações mixoides sem inflamação e constatou-se que estava mais relacionado com doentes imunodeprimidos, *tumor budding*, desmoplasia, IPN, nível anatómico, profundidade de invasão do tumor e, especialmente, com o risco metastático. [18]

### **3.2.4 Metástases para os tecidos moles e invasão extra-ganglionar**

Num estudo realizado por *S. Hasmat et al.* as metástases para os tecidos moles (MTM) foram definidas como agregados de células tumorais que invadiram o tecido mole, perdendo a continuidade ao tumor principal, mas sem invasão linfática. Definiu ainda a invasão extraganglionar (IEG) como metástases ganglionares que se estendem para além da cápsula do gânglio. Neste estudo com 535 doentes com CEC metastizado foram todos submetidos inicialmente a resseção cirúrgica, estando recomendada RTa a todos os doentes com MTM/IEG. Verificou-se a presença de gânglios positivos sem a presença de MTM/IEG em 22,4% dos doentes; 51,4% dos doentes apresentaram MTM, sendo que este foi o mesmo valor obtido para a IEG. Para além disso, 26,2% dos doentes apresentaram MTM sem IEG e o mesmo valor também se verificou para os doentes com IEG sem MTM; 25,2% dos doentes apresentaram MTM e IEG em simultâneo; 55,1% dos doentes faleceram e 20,2% apresentaram recorrência. A presença de MTM e IEG em simultâneo ou isoladamente relacionou-se com uma redução significativa da sobrevivência global, quando em comparação com tumores sem MTM e sem IEG. Constatou-se ainda que o risco de morte em doentes com MTM ou IEG era 1,5 vezes superior ao risco de morte de doentes sem nenhuma destas variantes e que a presença de ambos se associava a uma diminuição da sobrevivência livre de doença. As MTM estão ainda frequentemente relacionadas com um aumento do número

de gânglios linfáticos invadidos. Finalmente, observou-se que na presença de MTM, caso se controlem outros fatores, como o número de gânglios linfáticos invadidos e a IEG é possível reduzir a mortalidade. [19]

### 3.3 Marcadores moleculares de recidiva do CEC

#### 3.3.1 PD-L1

O ligando da proteína de morte celular programada – 1 é uma glicoproteína transmembranar expressa nas células tumorais que, com a sua ligação à proteína de morte celular – 1, [20] impede a ativação dos linfócitos T [21] citotóxicos CD8<sup>+</sup>, [22] comprometendo a imunidade anti tumoral. [23,24]

*Amoils et al.* realizou um estudo com 83 doentes onde os tumores foram considerados PD-L1 positivos quando presente em  $\geq 5\%$  de células tumorais e foram seguidamente divididos em 3 graus – grau 1: 5 – 10% células tumorais positivas; grau 2: 10 – 25% células tumorais positivas; grau 3:  $>25\%$  de células tumorais positivas. 65% dos tumores primários evidenciaram expressão de PD-L1 grau 1, seguindo-se o grau 2 e finalmente o grau 3. Para as metástases, 46% apresentaram positividade grau 2, seguindo-se o grau 1. Foram encontrados linfócitos a infiltrar o tumor em 65% dos tumores primários e em 90% das metástases regionais. Concluiu-se que a maioria dos tumores primários evidenciavam grau 1 enquanto as metástases evidenciavam grau 2 e uma ainda maior associação com recorrência regional. PD-L1 é assim um indicador de prognóstico favorável de metástases e nos casos em que se verificou infiltração do tumor por linfócitos evidenciou-se um risco elevado para a presença de IPN. [20]

*García-Pedrero et al.* efetuou um estudo com 100 doentes, 50 com metástases ganglionares e 50 controlos que não apresentavam metástases ganglionares. A expressão de PD-L1 foi classificada como negativa quando presente em  $<1\%$  de células tumorais, como muito baixa quando  $\geq 1\%$  e  $<10\%$ , como baixa quando  $\geq 10\%$  e  $<25\%$ , como intermédia quando  $\geq 25\%$  e  $<50\%$  ou como elevada quando  $\geq 50\%$ . Considerou-se o doente como PD-L1 positivo quando apresentava uma expressão  $\geq 25\%$ . Este *cut-off* relacionou-se com baixa diferenciação tumoral, crescimento desmoplásico, inflamação severa, níveis elevados de *tumor budding* e maior risco de metástases linfáticas. Neste estudo, a sobrevivência global aos 3 anos no grupo PD-L1 negativo foi de 74,5% e no grupo PD-L1 positivo foi de 52,7%. [21]

*García-Díez et al.* dirigiu um estudo com 48 CEC metastizados e 51 CEC sem metástases após 5 anos de seguimento. Quantificaram-se os doentes consoante a percentagem de células tumorais que evidenciavam coloração parcial ou completa assim como a intensidade

desta – negativo: 0; fraco: 1+; moderado: 2+; intenso: 3+. Foram ainda classificados como PD-L1 positivos os doentes com coloração em  $\geq 1\%$  das células tumorais (intensidade  $\geq 1+$ ). 26% dos tumores não metastizados evidenciaram expressão positiva de PD-L1, ao passo que esta esteve presente em 50% dos tumores metastizados. Evidenciou-se uma correlação positiva com o risco metastático e mau prognóstico. Observou-se uma expressão similar de PD-L1 nas metástases quando comparadas com o tumor primário, embora 21% tenham apresentado uma tendência para uma expressão aumentada deste marcador nas metástases, o que pode sugerir uma seleção clonal de células com expressão de PD-L1 no tumor primário. [23]

*Kraft et al.* procedeu à realização de um estudo com 29 doentes com metástases regionais, onde se definiu um cut-off de 10% para diferenciar os doentes com alta e baixa expressão de PD-L1, sendo que em cada grupo ficaram 16 e 13 doentes, respetivamente. Aquando da avaliação de metástases ganglionares, 16 doentes evidenciaram expressão elevada de PD-L1 nas células tumorais ao passo que 13 doentes apresentaram uma baixa expressão deste. A expressão média de PD-L1 nos tumores metastáticos foi de 32,8% e a densidade média de linfócitos CD8<sup>+</sup> intratumorais foi de 29,5%, sendo que uma densidade de expressão de linfócitos CD8<sup>+</sup> intratumorais  $\geq 25\%$  se associou a uma baixa diferenciação tumoral e baixa diferenciação de metástases, enquanto uma densidade  $< 25\%$  se associou a uma diferenciação moderada do tumor primário e de metástases. Tal como referido previamente para a densidade de linfócitos CD8<sup>+</sup>, observou-se que uma expressão de PD-L1  $\geq 10\%$  estava associada a uma baixa diferenciação do tumor primário, enquanto os tumores com baixa expressão de PD-L1 correlacionaram-se com uma diferenciação moderada do tumor primário. Curiosamente, a expressão de PD-L1 nas metástases regionais associou-se significativamente com a diferenciação do tumor primário. Todos os doentes com recorrência regional e metástases à distância faleceram da doença. Verificou-se uma sobrevivência global aos 5 anos de 58% e uma sobrevivência livre de doença loco regional de 78% aos 5 anos. [22]

*Wu et al.* desenvolveu um estudo com 18 doentes, sendo 13 eram tumores localmente avançados e 5 tumores metastizados. O gene de ativação de linfócitos 3 (LAG-3) é uma proteína transmembranar crítica para a indução e supressão da atividade dos linfócitos T e a sua inibição resulta num aumento da proliferação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>. Os linfócitos que infiltram o tumor foram classificados como ausentes, inativos ou ativos e a sua expressão foi encontrada em todos os tumores; 33% foram classificados como inativos e 67% como ativos. Os tumores com  $> 5\%$  de linfócitos a infiltrar o tumor com expressão LAG-3 foram considerados como positivos. A expressão de PD-L1 foi encontrada em 85% dos tumores

primários e em todos os tumores metastizados. Nos 5 tumores metastizados, 4 expressaram LAG-3 positivo e 1 foi negativo. Os linfócitos que infiltram o tumor foram encontrados mais comumente nas metástases, em comparação com os tumores primários. [24]

### 3.3.2 RAS e p53

*Campos et al.* avaliou a frequência da expressão de mutações p53 e RAS nos CEC. O p53 é um fator de transcrição nuclear que regula negativamente o ciclo celular, promove a apoptose e encontra-se normalmente desregulado durante a progressão tumoral. RAS é uma pequena GTPase que ativa as proteínas cinases ativadas por mitogénio (MAPKs) e outras vias de sinalização envolvidas na sobrevivência celular, proliferação e apoptose. Foram estudadas 162 lesões que foram excisadas de 128 doentes; 31 destes eram carcinomas *in situ* e 131 eram carcinomas invasivos. A expressão de p53 foi considerada como normal (*wild type*) quando poucas células dispersas evidenciavam coloração imunológica e foi considerada como anormal quando se verificou um aumento da expressão destas. Encontrou-se um aumento da expressão de p53 em 82,1% dos casos e uma expressão global de mutações RAS em 9,3% dos casos (3,2% em tumores *in situ* e 10,7% em tumores invasivos). As mutações RAS foram mais frequentemente associadas a tumores invasivos e a padrões infiltrativos, o que sugere que esta mutação favorece a progressão tumoral. Observou-se que a presença de ulceração e o aumento da expressão de p53 foram preditores de recorrência. Por fim, todos os tumores metastáticos evidenciaram uma expressão elevada de p53. [25]

### 3.3.3 Promotor da transcriptase reversa da telomerase

*Campos et al.* realizou um estudo em que avaliou a frequência de mutações TERTp. TERT é um complexo ribonucleoprotéico que sintetiza o DNA telomérico e é responsável por manter o tamanho do telómero. Mutações no promotor deste complexo criam locais de ligação para fatores de transcrição que levam a um aumento da expressão da telomerase e a um aumento do tamanho do telómero e da sua estabilidade, permitindo que as células cancerígenas se dividam e evitem o processo de senescência e apoptose. Tal como no estudo anterior foram classificadas em normal (*wild type*) e em anormal. Foram analisadas 153 lesões de 122 doentes para a presença de mutações TERTp; 31 eram tumores *in situ* e 121 eram tumores invasivos. A frequência global de mutações TERTp foi de 31,6%, estando presentes em 19,4% dos tumores *in situ* e em 34,7% dos tumores invasivos. Estas foram ainda identificadas mais frequentemente em tumores invasivos. As mutações TERTp foram significativamente mais comuns nos casos em que houve recorrência e presença de metástases; 14% dos casos recorreram e 6,6% dos casos metastizaram para os gânglios linfáticos. A presença da mutação TERTp em doentes com idade >75 anos evidenciou ser um fator independente

preditor de recorrência e também necessitar de um curto período de tempo até à recorrência e metastização. A ausência ou diminuição de linfócitos peritumorais, a invasão de tecido subcutâneo, margens periféricas e mutações TERTp demonstraram uma maior probabilidade de metástases; os dois primeiros associaram-se ainda a um curto período de tempo até à ocorrência de metástases. Apenas as mutações TERTp evidenciaram ser fatores de risco independentes para maior risco de metástases. Concluiu-se que doentes com mutações TERTp apresentam um risco substancial de efeitos adversos e pior prognóstico, estando relacionado com tumores mais agressivos, invasivos, maior taxa de recorrência e metastização nos tumores invasivos. [26]

### 3.3.4 Podoplanina

*Cañueto et al.* estudou a relação da podoplanina com as manifestações clinicopatológicas e com o prognóstico do doente. A expressão de podoplanina é essencial para a progressão e invasão tumoral. Neste estudo foram avaliados 94 CEC. Para avaliar a intensidade de expressão da podoplanina esta foi classificada como 0: ausente, 1: fraca, 2: moderada, 3: intensa; a percentagem de células positivas foi considerada como 0: ausente (<25% de células coradas), 1: fraca (25 – 50%), 2: moderada (50 – 75%), e 3: intensa (>75%). Posteriormente, a expressão de podoplanina foi transformada numa variável dicotómica em ausente e baixa com uma expressão -/+ (categoria 0) e em moderada e intensa com uma expressão ++/+++ (categoria 1). Dos 94 tumores estudados, 51,1% não apresentaram expressão de podoplanina, 28,8% apresentaram expressão baixa, 16% apresentaram expressão moderada e 4% apresentaram expressão intensa de podoplanina. Foi encontrada, maioritariamente, nos vasos linfáticos, mas em alguns casos em células tumorais. Observou-se que a expressão de podoplanina está associada à presença de desmoplasia, crescimento infiltrativo, invasão linfovascular, baixo grau de diferenciação e que se encontra mais comumente em tumores ulcerados. O tempo de latência até evolução clínica com mau prognóstico foi inferior nos doentes com expressão de podoplanina moderada/intensa (4,5 meses para os doentes com expressão de podoplanina moderada/ intensa e 11 meses para os doentes com expressão de podoplanina ausente/baixa), tal como o tempo de latência até ao desenvolvimento de metástases linfáticas (5 meses nos doentes com expressão moderada/intensa e 13 meses nos doentes com expressão ausente/baixa). Porém, a expressão de podoplanina só evidenciou ser uma variável independente nas metástases ganglionares. A presença de podoplanina em tumores primários foi relacionada com um risco mais elevado de metástases linfáticas ao longo do seguimento. [27]

### 3.3.5 Transcriptase da lectina-like 1

*Santos-Juanes et al.* procedeu à realização de um estudo para avaliar a relação da LLT1 com características clinicopatológicas e o prognóstico do doente. A transcriptase da lectina-like 1 também conhecida como lectina inibidora de osteoclastos é uma proteína lectina-like tipo C que pertence à superfamília dos recetores das células *Natural Killer* (NK). Este estudo continha 100 doentes, 50 deles com metástases ganglionares e os outros 50 sem metástases ganglionares. A expressão de LLT1 foi classificada como ausente/baixa, moderada ou elevada. 25% dos tumores apresentaram uma expressão ausente/baixa, 38% uma expressão moderada e 37% uma expressão elevada. Uma expressão elevada de LLT1 associou-se significativamente à presença de desmoplasia e a um aumento do risco de morte provocada pelo tumor, mas não foi observada qualquer relação com a sobrevivência livre de doença e a sobrevivência global. Expressões moderadas ou elevadas associaram-se a um aumento do risco de metástases ganglionares, demonstrando este marcador ser um preditor independente destas. [28]

### 3.3.6 Claudina 11

*Nissinen et al.* realizou um estudo com 175 doentes (65 com CEC esporádico devido a radiação UV, 56 com CEC *in situ*, 31 com queratoses actínicas (QA), 7 com queratoses seborreicas (QS) e 16 com pele normal) com o objetivo de avaliar a expressão de claudina 11 nas junções intercelulares de tumores queratinizantes. Observou-se que a expressão de mRNA CLDN11 estava aumentado nos CEC primários, mas não foi detetado em CEC metastáticos. Para além disso, evidenciou-se a presença de claudina 11 nos CEC moderadamente e bem diferenciados, mas não foi detetada nos CEC pouco diferenciados. A inibição da claudina 11 aumentou largamente a invasão das células tumorais, mas não modificou a viabilidade destas. [29]

### 3.3.7 Inositol-1,4,5-trisfosfato 5-fosfatase do tipo I

INPP5A é um fosfato de inositol associado à membrana do tipo 1 importante no desenvolvimento e progressão da queratose actínica para CEC. [30,31] Este está envolvido nas vias de sinalização de libertação do cálcio intracelular, tráfico membranar, quimiotaxia, atividade dos canais iónicos e muitas outras funções nucleares. [30]

*Cumsky et al.* desenvolveu um estudo com 189 casos (40 QA, 40 CEC que se desenvolveram a partir de QA, 27 CEC sem fatores de alto risco, 27 CEC com fatores de alto risco e 55 CEC metastizados e recorrentes), com o objetivo de avaliar o valor prognóstico da expressão de INPP5A nos CEC. Os níveis de expressão de IPP5A foram classificados de 0 – 3, sendo 3

uma expressão normal de INPP5A, 2 uma diminuição parcial da expressão, 1 uma diminuição marcada da expressão e 0 uma perda completa da expressão. 19,2% dos doentes eram imunodeprimidos à data da realização do estudo e verificou-se que uma expressão baixa de INPP5A foi mais comum neste grupo. 89,4% dos tumores evidenciaram um nível elevado de expressão de INPP5A, enquanto apenas 10,6% evidenciaram uma expressão baixa de INPP5A e nenhum doente apresentou ausência de expressão. Os tumores com baixa expressão de INPP5A, em comparação com os tumores com alta expressão demonstraram maior probabilidade de serem tumores com risco intermédio a elevado, maior diâmetro, mais invasivos, diferenciação moderada a baixa e com invasão perineural. A sobrevivência global para tumores com baixa expressão de INPP5A aos 3 anos, foi inferior aos tumores com elevada expressão de INPP5A, 42,3% e 73,7%, respetivamente; o mesmo aconteceu com a probabilidade de metástases locais, 48,0% e 13,3%, respetivamente, e com a morte relacionada com a doença aos 3 anos, 11,0% e 4,7%, respetivamente. Concluiu-se que uma baixa expressão de INPP5A se relaciona com maior agressividade do tumor, pior sobrevivência global e maior taxa de metástases locais. [30]

*Maly et al.* efetuou um estudo com 50 doentes com CEC metastizados e recorrentes, 52 tumores e 64 eventos (27 com recorrência local, 32 com metástases locais e 5 com metástases à distância), com o objetivo de avaliar o valor prognóstico da expressão do INPP5A em CEC metastizados e recorrentes. Tal como no estudo anterior, a expressão de INPP5A foi classificada de 0 – 3. Os níveis 2 e 3 foram considerados de alta expressão e os níveis 0 e 1 de baixa expressão. Criou-se ainda uma avaliação composta em que se avaliou a presença de tumor primário em associação com metástases e recorrência – caso apresentasse alta expressão era classificado como 0 e se apresentasse baixa expressão era classificado como 1, podendo então a avaliação final variar entre 0 – 2. 28,6% dos doentes eram imunodeprimidos, grupo este onde se verificou maior número de doença metastática. 78,8% dos tumores primários evidenciaram alta expressão, enquanto 21,2% evidenciaram baixa expressão; 69,2% dos tumores metastizados e recorrentes evidenciaram alta expressão, enquanto 30,8% evidenciaram baixa expressão. Verificou-se que a avaliação composta referida inicialmente foi preditora de sobrevivência global. Sendo que para uma avaliação composta de 0 a sobrevivência global foi de 62 meses e para uma avaliação composta  $\geq 1$  foi de 31 meses. Nos doentes com recorrência local observou-se que a imunodepressão era mais frequente nos doentes com avaliação composta  $\geq 1$  e ainda que uma expressão baixa de INPP5A no tumor primário se associava a pior sobrevivência global. [31]



### 3.3.8 Pre-mRNA processing factor 3

*Zuo et al.* realizou um estudo com 116 doentes (16 com pele normal, 42 com QA, 24 com CEC *in situ* e 34 CEC esporádicos) com o objetivo de investigar a expressão de PRP3, o seu papel e o mecanismo por detrás da malignidade do CEC. Observou-se que a expressão de PRP3 está aumentada nos tecidos com CEC, que a desregulação do PRP3 se associa a metástases ganglionares e à distância e que uma expressão aumentada de PRP3 se associa a uma sobrevivência global diminuída e a pior prognóstico. Um aumento da expressão de PRP3 promove a viabilidade e migração celular. Por outro lado, a diminuição do PRP3 evidenciou um efeito inibitório na viabilidade, migração e invasão celular. A perda de expressão de PRP3 não evidenciou nenhum impacto na viabilidade celular nas células benignas da epiderme humana. [32]

### 3.3.9 Antígeno A12 associado ao melanoma e p21

A família MAGE é constituída por vários antígenos que se relacionam com as células tumorais. Existem dois tipos, o tipo I que estão localizados apenas ao cromossoma X e que raramente são expressos em tecido normal e o tipo II que está presente no tecido humano sem alterações. Porém, durante a tumorigénese, ocorre hipometilação do tipo I, pelo que este se torna tumor-específico. [33]

*Zhao et al.* executou um estudo com 111 casos de CEC e 15 de pele sem alterações com o objetivo de investigar as implicações da expressão de MAGEA12 e p21 na patogénese do CEC. Observou-se que a maioria dos tumores apresentavam uma diferenciação moderada a alta e que 16,2% dos casos de CEC evidenciavam recorrência. Relativamente aos tecidos de pele normal, tanto a expressão de MAGEA12 no citoplasma como a de p21 no núcleo foram frequentemente encontradas, enquanto nos tecidos tumorais apenas 37,8% apresentaram expressão elevada de MAGEA12 e 39,6% de p21. Nos tecidos tumorais, a expressão de MAGEA12 foi mais frequentemente encontrada em idosos e em tumores pouco diferenciados (62,5%). A expressão de MAGEA12 associou-se a maiores taxas de recorrência e a pior sobrevivência livre de recorrência (6,7 meses no grupo com alta expressão e 11,5 meses no grupo com baixa expressão). Por outro lado, uma expressão elevada de p21 foi detetada mais frequentemente em doentes sem recorrência (44,1%) e uma expressão baixa de p21 associou-se a uma pior sobrevivência livre de recorrência. Quanto à relação de MAGEA12 e p21 demonstrou-se que na presença de uma expressão elevada de p21 é mais comum haver uma expressão baixa de MAGEA12 (46,4%) do que uma expressão alta desta (28,6%). Também se concluiu que a proliferação, migração e capacidades invasivas celulares reduzem após a inibição do MAGEA12. [33]

### **3.4 Novas terapêuticas em estudo para o CEC e o seu impacto no futuro**

#### **3.4.1 Inibidores do recetor do fator de crescimento epidérmico (EGFR)**

O recetor do fator de crescimento epidérmico é uma glicoproteína [36] que apresenta elevada expressão no CEC primário [2,34-36] e metastático [2] evidenciando um papel importante nas vias que regulam a proliferação celular, a invasão, a angiogénese e as metástases. [36] Existem duas classes dos inibidores do EGFR, os anticorpos monoclonais e os inibidores de tirosina cinase. Os primeiros – como o cetuximab, o panitumumab – atuam bloqueando o domínio extracelular do recetor, enquanto os segundos – como o erlotinib [1,2] – atuam a nível do domínio intracelular do recetor. [2]

##### **3.4.1.1 Cetuximab**

Cetuximab é um anticorpo monoclonal quimérico humano-murino [1,34,36] do tipo IgG1 [37] que se liga competitivamente ao domínio extracelular do EGFR inibindo a propagação da via de sinalização. [1]

No primeiro estudo realizado em 2011, foram estudados 36 doentes. [36] Observou-se uma sobrevivência livre de doença de 4 meses e uma sobrevivência global de 8 meses. [2,37] Num outro estudo com 14 doentes tratados com cetuximab em monoterapia ou com cetuximab em combinação com carboplatina observou-se que a combinação com carboplatina obteve uma maior sobrevivência livre de doença – 9,03 meses em comparação com os 3,55 meses quando administrado o cetuximab em monoterapia. [2] Por outro lado, num estudo com 23 doentes, concluiu-se que a utilização de cetuximab em combinação com radioterapia não prolonga a sobrevivência livre de doença nem a sobrevivência global em comparação com a utilização de radioterapia em combinação com quimioterapia à base de cisplatina. [2]

Nos diversos estudos analisados foram relatados alguns efeitos adversos como erupção acneiforme, [1,2,36] prurido, [1,2] descamação, [1] hipertricose, [1] alterações ungueais, [1,2] reações infusionais grau 4, [2,36] pneumopatia intersticial grau 3, [2,36] infeções [2] e hemorragia tumoral. [2]

O cetuximab está atualmente a ser estudado em associação com radioterapia, lenvatinib, avelumab, pembrolizumab e ainda como terapia neoadjuvante. [1]

##### **3.4.1.2 Panitumumab**

Panitumumab é um anticorpo monoclonal quimérico humano-murino do tipo IgG2. [37]

*Hourbeigt et al.* realizou um estudo com 25 doentes com o objetivo de avaliar a eficácia e segurança do panitumumab em monoterapia ou em associação a radioterapia, no tratamento de CEC irressecáveis. Em 15 dos doentes foi administrada radioterapia concomitante. Verificou-se uma taxa de resposta de 52% (16% de remissões completas, tendo sido todas em tratamentos com radioterapia concomitante e 36% de remissões parciais, em que 20% tiveram radioterapia concomitante). A sobrevivência média livre de doença foi de 6,9 meses e a sobrevivência global média foi de 10,5 meses. Como efeitos adversos observou-se foliculite acneiforme, hipomagnesémia, astenia e alterações dermatológicas. Concluiu-se que a resposta ao tratamento foi superior aquando do uso de radioterapia em combinação ao panitumumab em 60% dos doentes, havendo assim um efeito sinérgico entre estes. [37]

Num outro estudo com 16 doentes foi investigada a ação do panitumumab em CEC avançados, no qual 31% dos doentes evidenciaram resposta [1,36] (12% com remissão completa e 19% com remissão parcial), a sobrevivência média livre de doença foi de 8 meses e a sobrevivência global foi de 11 meses. [36] Concluiu-se que o panitumumab é uma boa alternativa ao cetuximab quando este provoca reações anafiláticas, [1] uma vez que o cetuximab expressa  $\alpha$ -1,3-Galactose ( $\alpha$ -Gal) que na presença de anticorpos IgE anti  $\alpha$ -Gal, por sensibilização prévia, pode provocar reação anafilática, enquanto o panitumumab não expressa  $\alpha$ -Gal. [37]

### **3.4.1.3 Erlotinib**

*Gold et al.* estudou 39 doentes com CEC loco regional recorrente ou metastizado e que não eram candidatos a terapêutica curativa. Apenas 29 doentes terminaram as primeiras 4 semanas de tratamento e foi com base nesses que se fez a avaliação. 10% evidenciaram remissão parcial, 62% doença estável e 28% doença evolutiva. A sobrevivência média livre de doença foi de 4,7 meses e a sobrevivência global foi de 13 meses. Como efeitos adversos destacaram-se a fadiga, erupção acneiforme, desidratação e síncope. [35]

Em 2013, *Heath et al.* realizou outro estudo com 15 doentes com CEC localmente avançado ou metastizado onde se avaliou a eficácia da terapêutica de erlotinib em associação à radioterapia. A sobrevivência aos 2 anos foi de 65% e a sobrevivência livre de doença ao fim de 2 anos foi de 60%. Como efeitos adversos observaram-se mucosite e diarreia. [36]

## **3.4.2 Anticorpos anti ligando da proteína de morte celular programada – 1**

PD-1 é uma proteína transmembranar expressa pelas células T, células B, monócitos, células NK e células dendríticas. [1] A ligação desta aos seus ligandos (PD-L1 e PD-L2), [39] que são expressos na superfície das células tumorais, [1] inibe a resposta dada pelas células T, porém

os anticorpos anti PD-L1 permitem restaurar esta função e obter assim uma resposta imune antitumoral. [39] Este mecanismo tem demonstrado ser muito útil nos CEC, pois estes têm uma elevada carga mutagénica, o que fornece uma boa resposta a estes anticorpos. [1,36,38,40]

#### **3.4.2.1 Cemiplimab**

O cemiplimab é um anticorpo monoclonal humano dirigido contra o PD-1. [1,36,38,41]

*Midgen et al.* realizou um estudo de fase 1 com 26 CEC avançados e de fase 2 com 59 CEC localmente avançados ou metastizados. A sobrevivência média livre de doença foi de 18,4 meses e a sobrevivência global estimada aos 24 meses foi de 70,6%. [36] Estes resultados mostram que tumores localmente avançados ou metastizados apresentam uma boa resposta ao cemiplimab, com uma resposta de aproximadamente 50% [38].

Os principais efeitos adversos no estudo de fase 1 foram fadiga, obstipação, anorexia, diarreia, hipercalcémia, hipofosfatémia, náuseas e infeções do trato urinário; no estudo de fase 2 foram diarreia, fadiga, náuseas, erupção cutânea, celulite, pneumonite, hipercalcémia, efusão pleural e morte. [38]

#### **3.4.2.2 Pembrolizumab**

O pembrolizumab é um anticorpo monoclonal humano dirigido contra o PD-1. [1]

*Maubec et al.* realizou um estudo com 57 doentes. A sobrevivência global média foi de 25,3 meses, sendo a sobrevivência aos 12 meses de 75,5%. Este anticorpo monoclonal associou-se a uma melhoria da qualidade de vida destes doentes. [39]

*Grob et al.* efetuou um estudo com 105 doentes, tendo estes sido divididos em 2 grupos – CEC com metástases à distância e CEC com recorrência loco regional. A sobrevivência média livre de doença foi de 6,9 meses, 32,4% aos 12 meses. Além disso, a sobrevivência global aos 12 meses foi de 60,3%. [40]

*Ferrarotto et al.* procedeu a um estudo com 19 doentes. A sobrevivência média livre de doença foi de 2,04 meses e a sobrevivência global média foi de 8,31 meses. [43]

Como efeitos adversos observaram-se fadiga, [39,40,43] astenia, [40] diarreia, [39] hipotireoidismo, [39,40,43] prurido, [39,40] erupção eczematosa, [39] erupção maculopapular, [43], reações cutâneas severas, neuropatia de um nervo craniano associada ao tratamento,

pneumonite, insuficiência adrenal, hipertireoidismo, [40] artralgias em doentes com artrite reumatoide prévias e disfunção pancerebelar. [43]

Atualmente, o pembrolizumab está a ser estudado em combinação com cetuximab, AST-008, abexinostat e sonidegib. [1]

### **3.4.2.3 Nivolumab**

O nivolumab é um anticorpo monoclonal humano dirigido contra o PD-1. [1]

*In et al.* realizou um estudo com 26 doentes com CEC avançado, sendo que 13 doentes receberam cemiplimab, 7 pembrolizumab e 6 nivolumab. A sobrevivência média livre de doença foi de 5,4 meses. Neste estudo, 46,2% dos doentes responderam ao cemiplimab, 42,9% ao pembrolizumab e 33,3% ao nivolumab. Foram relatados alguns efeitos adversos graves como cetoacidose diabética/coma hiperosmolar, hemorragia por coagulopatia, cardiomiopatia e insuficiência respiratória/pneumonite. [42]

Numa revisão narrativa com 18 CEC avançados tratados com nivolumab e pembrolizumab observou-se uma boa resposta ao tratamento em 17 doentes. [41]

Atualmente, está a ser estudada a associação de nivolumab com pembrolizumab, com ipilimumab e com anticorpos monoclonais anti CTLA-4 em doentes imunodeprimidos. [1]

## 4 Resultados

**Tabela 2:** Sumário dos estudos

Ano	Autor(es)	Tipo de estudo	Tumores estudados (n)	Fator de risco/ Agente terapêutico	Resultados e valor prognóstico
2020	<i>Haug et al.</i>	Prospetivo	1399 CEC	IPN	OS aos 5 anos: <ul style="list-style-type: none"> <li>– Com desmoplasia e IPN: 17%</li> <li>– Com desmoplasia sem IPN: 50%</li> <li>– Sem desmoplasia: 89%</li> </ul>
2018	<i>K. Khan et al.</i>	Retrospectivo	598 CEC	IPN	Taxa de recorrência global: 6,7%, dos doentes com IPN 19,1% recorreram e dos sem IPN apenas 5,6% recorreram
2020	<i>Trosman et al.</i>	Retrospectivo	104 CEC	IPN	DFS (cirurgia): 71%, DFS (cirurgia + RTa): 65%, DFS (cirurgia + QRT): 58%
2021	<i>Hazim et al.</i>	Retrospectivo	21 CEC	IPN	OS aos 2 anos de 85%
2019	<i>Cañueto et al.</i>	Multicêntrico, retrospectivo	98 CEC com IPNi e 12 CEC com IPNc	IPN	A radioterapia pós procedimento cirúrgico demonstrou ser benéfica, em comparação com apenas vigilância em tumores com IPN e margens positivas após cirurgia, favorecendo o prognóstico a longo prazo
2020	<i>Karayannopoulou et al.</i>	Retrospectivo	25 CEC agressivos e 27 CEC não agressivos	<i>Tumor budding</i>	Baixa OS
2017	<i>Gonzalez-Guerrero et al.</i>	Retrospectivo	49 CEC metastizados	<i>Tumor budding</i>	OS (com tumor budding): 45%

			e 49 CEC não metastizados		OS (sem tumor budding): 95%
2019	<i>Fujimoto, et al.</i>	Retrospectivo	24 CEC metastizados e 24 CEC não metastizados	<i>Tumor budding</i>	Correlação com a presença de metástases (presente em 83,3% dos tumores metastizados)
2018	<i>E. Hernández-Ruiz, et al.</i>	Retrospectivo	102 CEC	Fibrose peritumoral	Correlação com um maior risco metastático
2020	<i>S. Hasmat et al.</i>	Prospetivo	535 CEC metastizado para as parótidas e/ou para o pescoço	MTM e IEG	OS reduzida, com risco de morte 1,5 vezes superior aos tumores sem MTM ou IEG
2018	<i>Amoils et al.</i>	Retrospectivo	83 CEC	PD-L1	Os tumores primários associaram-se a uma menor expressão de PD-L1 enquanto as metástases se associaram a uma expressão mais elevada de PD-L1
2017	<i>García-Pedrero et al.</i>	Retrospectivo	50 CEC com metástases linfáticas e 50 CEC sem metástases linfáticas	PD-L1	OS aos 3 anos: – PD-L1 negativo: 74,5% – PD-L1 positivo: 52,7%
2018	<i>García-Díez et al.</i>	Retrospectivo	48 CEC metastizado e 51 CEC não metastizado	PD-L1	A expressão de PD-L1 relacionou-se com maior risco metastático
2020	<i>Kraft et al.</i>	Retrospectivo	29 CEC com metástases regionais	PD-L1	OS de 58% aos 5 anos DFS de 78% aos 5 anos

2020	<i>Wu et al.</i>	Retrospectivo	15 CEC localmente avançados e 5 CEC metastizados	PD-L1	Foi frequentemente encontrada a expressão de LAG-3 pelos linfócitos infiltrantes de tumor
2020	<i>Campos et al.</i>	Retrospectivo	31 CEC <i>in situ</i> , 131 carcinomas invasivos	RAS e p53	Expressão global de mutações RAS: 9,3% Expressão aumentada de p53: 82,1%
2018	<i>Campos et al.</i>	Retrospectivo	152 CEC	TERTp	Mutação TERTp presente em 19,4% dos tumores <i>in situ</i> e em 34,7% dos tumores invasivos
2016	<i>Cañueto et al.</i>	Prospetivo e retrospectivo	94 CEC	Podoplanina	A expressão de podoplanina associou-se a menor DFS
2019	<i>Santos-Juanes et al.</i>	Retrospectivo	50 CEC metastizados e 50 CEC não metastizados	LLT1	Baixa DFS
2017	<i>Nissinen et al.</i>	Retrospectivo	65 CEC esporádico, 56 CEC <i>in situ</i> , 31 QA, 7 QS e 16 sem alterações	Claudina 11	Evidenciou-se um aumento de expressão de claudina 11 nos tumores primários, sendo que esta não foi encontrada em tumores metastáticos
2018	<i>Cumsky et al.</i>	Retrospectivo	40 QA, 40 CEC a partir de QA, 27 CEC sem fatores de alto risco, 55 CEC metastáticos e recorrentes	INPP5A	OS aos 3 anos: – Baixa expressão de INPP5A: 42,3% – Elevada expressão de INPP5A: 73,7%
2019	<i>Maly et al.</i>	Multicêntrico, retrospectivo	27 CEC com recorrência	INPP5A	OS:



			local, 32 CEC com metástases locais e 5 CEC com metástases à distância		<ul style="list-style-type: none"> <li>– Avaliação composta de 0: 62 meses</li> <li>– Avaliação composta <math>\geq</math> 1: 31 meses</li> </ul>
2020	<i>Zuo et al.</i>	Retrospectivo	16 sem alterações, 42 QA, 24 CEC <i>in situ</i> e 34 CEC esporádicos	PRP3	OS diminuída
2019	<i>Zhao et al.</i>	Retrospectivo	111 CEC e 15 sem alterações	MAGEA12 e p21	DFS: <ul style="list-style-type: none"> <li>– Alta expressão de MAGEA12: 6,7 meses</li> <li>– Baixa expressão de MAGEA12: 11,5 meses</li> </ul>
2011	<i>Maubec et al.</i>	Prospetivo	36 CEC	Cetuximab	DFS: 4 meses OS: 8 meses
2017	<i>Dereure et al.</i>	Retrospectivo	14 CEC	Cetuximab em monoterapia ou em associação a carboplatina	DFS: <ul style="list-style-type: none"> <li>– Cetuximab em monoterapia: 3,55 meses</li> <li>– Cetuximab em associação a carboplatina: 9,03 meses</li> </ul>
2020	<i>Hourbeigt et al.</i>	Monocêntrico, retrospectivo	25 CEC irressecáveis	Panitumumab em monoterapia ou em associação a radioterapia	DFS média: 6,9 meses OS média: 10,5 meses
2014	<i>Foote et al.</i>	Retrospectivo e prospectivo	16 CEC avançados	Panitumumab	DFS média: 8 meses OS média: 11 meses

2018	<i>Gold et al.</i>	Prospetivo; Estudo clínico aberto de fase 2	29 CEC com recorrência loco regional ou metástases e não candidatos a cirurgia curativa	Erlotinib	DFS média: 4,7 meses OS: 13 meses
2013	<i>Heath et al.</i>	Prospetivo; Estudo clínico aberto de fase 1	15 CEC localmente avançado ou metastatizado	Erlotinib em associação a radioterapia	DFS aos 2 anos: 60% OS aos 2 anos: 65%
2018	<i>Midgen et al.</i>	Prospetivo; Estudo clínico aberto de fase 1 e fase 2	Fase 1: 26 CEC avançados Fase 2: 59 CEC localmente avançados ou metastizados	Cemiplimab	Fase 2: – DFS: 18,4 meses – OS estimada aos 2 anos: 70,6%
2020	<i>Maubec et al.</i>	Prospetivo	57 CEC	Pembrolizumab	OS média: 25,3 meses
2020	<i>Grob et al.</i>	Prospetivo	105 CEC	Pembrolizumab	DFS: 6,9 meses OS ao 1 ano: 60,3%
2021	<i>Ferrarotto et al.</i>	Prospetivo; Estudo clínico aberto de fase 1 e fase 2	19 CEC	Pembrolizumab	DFS: 2,04 meses OS média: 8,31 meses
2020	<i>In et al.</i>	Retrospectivo	26 CEC avançados	13 Cemiplimab 7 Pembrolizumab 6 Nivolumab	DFS média: 5,4 meses

## 5 Discussão e conclusão

A identificação de novos fatores de risco que possam estar implicados na agressividade e no prognóstico dos CEC é importante quer para melhorar os sistemas de estadiamento, quer para identificar potenciais alvos moleculares, premissa fundamental para o desenvolvimento de possíveis terapêuticas que possam melhorar a qualidade de vida dos doentes e aumentar a sua sobrevivência global.

Dentro dos novos fatores de risco que foram estudados nesta revisão narrativa podemos dividi-los em marcadores histológicos e marcadores moleculares.

Dentro dos marcadores histológicos, a invasão perineural apresenta um lugar de destaque, sendo atualmente amplamente estudada, já tendo sido demonstrado que esta é um fator de risco independente para o desenvolvimento de metástases e de recorrência local, sobretudo nos primeiros 2 anos. Para além da invasão perineural também foi estudado o *tumor budding*, tendo este demonstrado ser um fator de risco independente para invasão linfovascular, mas não apresentando qualquer valor em tumores com uma invasão mais extensa. Por outro lado, a presença de fibrose peritumoral associa-se a um maior risco de metástases, tal como a presença de metástases para os tecidos moles e de invasão extra-ganglionar se associam a um aumento do número de gânglios linfáticos invadidos e a uma redução significativa da sobrevivência global.

Dentro dos marcadores moleculares salienta-se o PD-L1. Este apresentou uma menor expressão em tumores primários, enquanto nas metástases apresentou uma maior expressão, estando também neste caso associado a uma maior taxa de recorrência local e a pior prognóstico. Quanto às mutações RAS e p53, estas estão presentes em tumores com maior agressividade local, e uma expressão aumentada de p53 demonstrou ainda ser um preditor de recorrência. Relativamente às mutações TERTp, evidenciaram ser um fator de risco independente de recorrência local e associaram-se a um maior risco de metástases linfáticas. A podoplanina é também um fator de risco independente para metástases ganglionares. Além destes fatores, uma expressão elevada de LLT1 demonstrou ser um fator de risco independente para metástases ganglionares. Quanto à claudina 11, a perda de expressão desta associou-se a CEC com estadio mais avançado. O INPP5A demonstrou que uma baixa expressão se associa a maior agressividade, pior sobrevivência global e a uma maior taxa de metástases locais. Quanto ao PRP3, a sua desregulação associa-se a metástases ganglionares e à distância e o aumento da sua expressão levou a pior prognóstico. A respeito dos MAGEA12 e p21, na presença de uma expressão elevada de p21, é mais comum haver uma baixa expressão de MAGEA12. Uma expressão elevada de p21 foi

detetada mais frequentemente em doentes sem recorrência e, por outro lado, uma baixa expressão associou-se a pior sobrevivência livre de doença. Assim sendo, existe uma maior probabilidade de recorrência local quando há expressão de PD-L1, de p53 e de mutações TERTp; há um maior risco de metástases linfáticas quando há expressão de podoplanina, presença de mutações TERTp, níveis elevados de LLT1 e desregulação do PRP3; e há um maior risco de metástases locais e à distância com o aumento da expressão de PD-L1, com uma baixa expressão de INPP5A e com a desregulação do PRP3.

Em suma, concluo que todos os fatores de risco abordados apresentam valor prognóstico e que as novas abordagens terapêuticas que estão a ser desenvolvidas diariamente permitem a obtenção de um melhor prognóstico, sendo fulcral a continuação da investigação de novas modalidades terapêuticas.

## **6 Agradecimentos**

Agradeço ao Professor Doutor Ricardo José David Costa Vieira pela mestria na orientação e por todo o apoio fornecido ao longo da realização deste trabalho.

Agradeço aos meus pais, especialmente à minha mãe, pelo apoio incondicional ao longo dos meus 23 anos para que este sonho se concretizasse.

Agradeço ainda à Beatriz por toda a paciência e amizade demonstradas em todos os momentos.

## 7 Referências bibliográficas

1. Corchado-Cobos, R., García-Sancha, N., González-Sarmiento, R., Pérez-Losada, J., Cañueto, J. (2020). *Cutaneous Squamous Cell Carcinoma: From Biology to Therapy*. International Journal of Molecular Sciences, 21(8), 2956.
2. Maubec, E. (2020). *Update on the Management of Cutaneous Squamous Cell Carcinoma*. Acta Dermato-Venereologica 2020, 100.
3. Cheng, J., Yan, S. (2016). *Prognostic variables in high-risk cutaneous squamous cell carcinoma: a review*. Journal of Cutaneous Pathology, 43(11), 994–1004.
4. Bander, T. S., Nehal, K. S., Lee, E. H. (2019). *Cutaneous Squamous Cell Carcinoma*. Dermatologic Clinics, 37(3), 241–251.
5. McDowell, L., Yom, S. S. (2019). *Locally advanced non-melanomatous skin cancer: Contemporary radiotherapeutic management*. Oral Oncology, 99, 104443.
6. Garcia, M. P. P., Puchades, A. M., Jiménez, O. S. (2019). *Perineural Invasion in Cutaneous Squamous Cell Carcinoma*. Actas Dermo-Sifiliográficas, Vol. 110 Issue 6, p. 426–433.
7. Hazim, A. Z., Reed, C. T., Price, K. A., Foote, R. L., Ma, D. J., Neben-Wittich, M., DeLone, D. R., Jenkins, S. M., Smith, C. Y., Chintakuntlawar, A. V. (2021). *Survival outcomes in locally advanced cutaneous squamous cell carcinoma presenting with clinical perineural invasion alone*. Head & Neck, 43(7), 1995–2001.
8. Karia, P. S., Morgan, F. C., Ruiz, E. S., Schmults, C. D. (2017). *Clinical and Incidental Perineural Invasion of Cutaneous Squamous Cell Carcinoma*. JAMA Dermatology, 153(8), 781.
9. Haug, K., Breuninger, H., Metzler, G., Eigentler, T., Eichner, M., Häfner, H.-M., Schnabl, S. M. (2020). *Prognostic impact of perineural invasion in cutaneous squamous cell carcinoma. Results of a prospective study of 1399 tumors*. Journal of Investigative Dermatology.
10. Jambusaria-Pahlajani, A., Karia, P. S., Schmults, C. D. (2020). *Risk Factors Party Together: The Role of Perineural Invasion and Desmoplasia in Cutaneous Squamous Cell Carcinoma Prognosis*. Journal of Investigative Dermatology, 140(10), 1893–1894.
11. Khan, K., Mykula, R., Kerstein, R., Rabey, N., Bragg, T., Crick, A., Heppell, S., Budny, P., Potter, M. (2018). *A 5-year follow-up study of 633 cutaneous SCC excisions: Rates of local recurrence and lymph node metastasis*. Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery, 71(8), 1153–1158.
12. Trosman, S. J., Zhu, A., Nicolli, E. A., Leibowitz, J. M., Sargi, Z. B. (2020). *High-Risk Cutaneous Squamous Cell Cancer of the Head and Neck: Risk Factors for Recurrence and Impact of Adjuvant Treatment*. The Laryngoscope, 00: 1-8.

13. Chen, J. J., Harris, J. P., Kong, C. S., Sunwoo, J. B., Divi, V., Horst, K. C., Aasi, S. Z., Hollmig, S. T., Hara, W. Y. (2018). *Clinical perineural invasion of cutaneous head and neck cancer: Impact of radiotherapy, imaging, and nerve growth factor receptors on symptom control and prognosis*. *Oral Oncology*, 85, 60–67.
14. Cañueto, J., Jaka, A., Corchete, L. A., González-Pérez, A. M., García-Castro, R., Fuente, M., Membrive, I., March, Á., Mañes, A., Posada, R., Pujol, R. M., Román-Curto, C., Toll, A. (2019). *Postoperative radiotherapy provides better local control and long-term outcome in selective cases of cutaneous squamous cell carcinoma with perineural invasion*. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*.
15. Karayannopoulou, G., Panteris, E., Kanitakis, J. (2020). *Tumour Budding Is an Independent Predictive Factor of Cutaneous Squamous-cell Carcinoma Aggressiveness*. *Anticancer Research*, 40(5), 2695–2699.
16. Gonzalez-Guerrero, M., Martínez-Cambolor, P., Vivanco, B., Fernández-Vega, I., Munguía-Calzada, P., Gonzalez-Gutierrez, M. P., Rodrigo, R. P., Galache, C., Santos-Juanes, J. (2017). *The adverse prognostic effect of tumor budding on the evolution of cutaneous head and neck squamous cell carcinoma*. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 76(6), 1139–1145.
17. Fujimoto, M., Yamamoto, Y., Takai, T., Fujimoto, N., Ogawa, K., Yoshikawa, T., Matsuzaki, I., Takahashi, Y., Iwahashi, Y., Warigaya, K., Kojima, F., Jinnin, M., Murata, S. (2019). *Tumor Budding Is an Objective High-risk Factor Associated With Metastasis and Poor Clinical Prognosis in Cutaneous Squamous Cell Carcinoma Sized <4 cm*. *The American Journal of Surgical Pathology*, 43(7), 975–983.
18. Hernández-Ruiz, E., Hernández-Muñoz, I., Masferrer, E., Ferrándiz-Pulido, C., Andrades, E., Gimeno, J., Duran, X., García-Patos, V., Pujol, R. M., Toll, A. (2018). *A Myxoid Fibrotic Reaction Pattern is Associated with Metastatic Risk in Cutaneous Squamous Cell Carcinoma*. *Acta Dermato Venereologica*, 0.
19. Hasmat, S., Mooney, C., Gao, K., Palme, C. E., Ebrahimi, A., Ch'ng, S., Gupta, R., Low, T.-H., Clark, J. (2020). *Regional Metastasis in Head and Neck Cutaneous Squamous Cell Carcinoma: An Update on the Significance of Extra-Nodal Extension and Soft Tissue Metastasis*. *Annals of Surgical Oncology*.
20. Amoils, M., Kim, J., Lee, C., Sunwoo, J. B., Colevas, A. D., Aasi, S. Z., Hollmig, S. T., Ma, Y., Divi, V. (2018). *PD-L1 Expression and Tumor-Infiltrating Lymphocytes in High-Risk and Metastatic Cutaneous Squamous Cell Carcinoma*. *Otolaryngology–Head and Neck Surgery*, 019459981878805.
21. García-Pedrero, J. M., Martínez-Cambolor, P., Diaz-Coto, S., Munguía-Calzada, P., Vallina-Alvarez, A., Vazquez-Lopez, F., Rodrigo, J. P., Santos-Juanes, J. (2017). *Tumor programmed cell death ligand 1 expression correlates with nodal metastasis in patients*

- with cutaneous squamous cell carcinoma of the head and neck*. Journal of the American Academy of Dermatology, 77(3), 527–533.
22. Kraft, S., Gadkaree, S. K., Deschler, D. G., Lin, D. T., Hoang, M. P., & Emerick, K. S. (2020). *Programmed cell death ligand-1 and cytotoxic T cell infiltrates in metastatic cutaneous squamous cell carcinoma of the head and neck*. Head & Neck, 1-9.
  23. García-Díez, I., Hernández-Ruiz, E., Andrades, E., Gimeno, J., Ferrándiz-Pulido, C., Yébenes, M., García-Patos, V., Pujol, R. M., Hernández-Muñoz, I., Toll, A. (2018). *PD-L1 Expression is Increased in Metastasizing Squamous Cell Carcinomas and Their Metastases*. The American Journal of Dermatopathology, 40(9), 647–654.
  24. Wu, S., Slater, N. A., Sayed, C. J., Googe, P. B. (2020). *PD-L1 and LAG-3 expression in advanced cutaneous squamous cell carcinomas*. Journal of Cutaneous Pathology, 1-6.
  25. Campos, M. A., Macedo, S., Fernandes, M. S., Pestana, A., Pardal, J., Batista, R., Vinagre, J., Sanches, A., Baptista, A., Lopes, J. M., Soares, P. (2020). *Prognostic Significance of RAS Mutations and P53 Expression in Cutaneous Squamous Cell Carcinomas*. Genes, 11(7), 751.
  26. Campos, M. A., Macedo, S., Fernandes, M., Pestana, A., Pardal, J., Batista, R., Lopes, J. M., Soares, P. (2018). *TERT promoter mutations are associated with poor prognosis in cutaneous squamous cell carcinoma*. Journal of the American Academy of Dermatology.
  27. Cañueto, J., Cardeñoso-Álvarez, E., Cosano-Quero, A., Santos-Briz, Á., Fernández-López, E., Pérez-Losada, J., Román-Curto, C. (2016). *The expression of podoplanin is associated with poor outcome in cutaneous squamous cell carcinoma*. Journal of Cutaneous Pathology, 44(2), 144–151.
  28. Santos-Juanes, J., Fernández-Vega, I., Lorenzo-Herrero, S., Sordo-Bahamonde, C., Martínez-Cambor, P., García-Pedrero, J. M., Vivanco, B., Galache-Osuna, C., Vazquez-Lopez, F., Gonzalez, S., Rodrigo, J. P. (2019). *Lectin-like transcript 1 (LLT1) expression is associated with nodal metastasis in patients with head and neck cutaneous squamous cell carcinoma*. Archives of Dermatological Research.
  29. Nissinen, L., Siljamäki, E., Riihilä, P., Piipponen, M., Farshchian, M., Kivisaari, A., Kallajoki, M., Raiko, L., Peltonen, J., Kähäri, V.-M. (2017). *Expression of claudin-11 by tumor cells in cutaneous squamous cell carcinoma is dependent on the activity of p38δ*. Experimental Dermatology, 26(9), 771–777.
  30. Cumksy, H. J., Costello, C. M., Zhang, N., Butterfield, R., Buras, M., Schmidt, J., Drenner, K., Nelson, S. A., Ochoa, S. A., Baum, C. L., Pittelkow, M. R., DiCaudo, D. J., Sekulic, A., Mangold, A. R. (2018). *The Prognostic Value of Inositol Polyphosphate 5-Phosphatase in Cutaneous Squamous Cell Carcinoma*. Journal of the American Academy of Dermatology.
  31. Maly, C. J., Cumksy, H. J. L., Costello, C. M., Schmidt, J. E., Butterfield, R. J., Zhang, N., DiCaudo, D. J., Nelson, S. Smith, M. L., Ochoa, S. A., Baum, C. L., Nagel, T. H., Pittelkow,



- M. R., Sekulic, A., Mangold, A. R. (2019). *Prognostic Value of Inositol Polyphosphate-5-Phosphatase Expression in Recurrent and Metastatic Cutaneous Squamous Cell Carcinoma*. *Journal of the American Academy of Dermatology*.
32. Zuo, S., Li, X., Bao, W., Li, S. (2020). *Pre-mRNA processing factor 3 enhances the progression of keratinocyte-derived cutaneous squamous cell carcinoma by regulating the JAK2/STAT3 pathway*. *Scientific Reports*, 10(1).
33. Zhao, G., Bae, J. Y., Zheng, Z., Park, H. S., Chung, K. Y., Roh, M. R., Jin, Z. (2019). *Overexpression and Implications of Melanoma-associated Antigen A12 in Pathogenesis of Human Cutaneous Squamous Cell Carcinoma*. *Anticancer Research*, 39(4), 1849–1857.
34. Picard, A., Pedeutour, F., Peyrade, F., Saudes, L., Duranton-Tanneur, V., Chamorey, E., Cardot-Leccia, N., Sudaka, A., Ettaiche, M., Benchetrit, M., Poissonnet, G., Weinbreck, N., Dadone, B., Lacour, J.-P., Passeron, T., Montaudié, H. (2017). *Association of Oncogenic Mutations in Patients With Advanced Cutaneous Squamous Cell Carcinomas Treated With Cetuximab*. *JAMA Dermatology*, 153(4), 291.
35. Gold, K. A., Kies, M. S., William, W. N., Johnson, F. M., Lee, J. J., Glisson, B. S. (2018). *Erlotinib in the treatment of recurrent or metastatic cutaneous squamous cell carcinoma: A single-arm phase 2 clinical trial*. *Cancer*, 124(10), 2169–2173.
36. Gellrich, F. F., Hüning, S., Beisert, S., Eigentler, T., Stockfleth, E., Gutzmer, R., Meier, F. (2019). *Medical treatment of advanced cutaneous squamous-cell carcinoma*. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 33(S8), 38–43.
37. Hourbeigt, K., Ehret, M., Visseaux, L., Durlach, A., Petit, A., Sanchez, J., Grange-Prunier, A., Barbe, C., Servagi-Vernat, S., Grange, F. (2020). *Efficacy and safety of panitumumab alone or in association with radiotherapy in unresectable cutaneous squamous-cell carcinoma*. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*.
38. Migden, M. R., Rischin, D., Schmults, C. D., Guminski, A., Hauschild, A., Lewis, K. D., Chung, C. H., Hernandez-Aya, L., Lim, A. M., Chang, A. L. S., Rabinowits, G., Thai, A. A., Dunn, L. A., Hughes, B. G. M., Khushalani, N. I., Modi, B., Schadendorf, D., Gao, B., Seebach, F., Li, S., Li, J., Mathias, M., Booth, J., Mohan, K., Stankevich, E., Babiker, H. M., Brana, I., Gil-Martin, M., Homsí, J., Johnson, M. L., Monero, V., Niu, J., Owonikoko, T. K., Papadopoulos, K. P., Yancopoulos, I., Lowi, I., Fury, M. G. (2018). *PD-1 Blockade with Cemiplimab in Advanced Cutaneous Squamous-Cell Carcinoma*. *New England Journal of Medicine*, 379(4), 341–351.
39. Maubec, E., Boubaya, M., Petrow, P., Beylot-Barry, M., Basset-Seguín, N., Deschamps, L., Grob, J.-J., Dreno, B., Scheer-Senyarich, I., Bloch-Queyrat, C., Leccia, M.-T., Stefan, A., Saiag, P., Grange, F., Meyer, N., Quatrebarbes, J., Dinulescu, M., Legoupil, D., Machet, L., Dereure, O., Zehou, O., Montaudié, H., Wierzbička-Hainaut, E., Corre, Y. L., Mansard,

- S., Guégan, S., Arnault, J.-P., Dalac, S., Aubin, F., Alloux, C., Lopez, I., Cherbal, S., Tibi, A., Lévy, V. (2020). *Phase II Study of Pembrolizumab As First-Line, Single-Drug Therapy for Patients With Unresectable Cutaneous Squamous Cell Carcinomas*. *Journal of Clinical Oncology*, JCO.19.03357.
40. Grob, J.-J., Gonzalez, R., Basset-Seguín, N., Vornicova, O., Schachter, J., Joshi, A., Meyer, N., Grange, F., Piulats, J. M., Bauman, J. R., Zhang, P., Gumuscu, B., Swaby, R. F., Hughes, B. G. M. (2020). *Pembrolizumab Monotherapy for Recurrent or Metastatic Cutaneous Squamous Cell Carcinoma: A Single-Arm Phase II Trial (KEYNOTE-629)*. *Journal of Clinical Oncology*, JCO.19.03054.
41. Ogata, D., Tsuchida, T. (2019). *Systemic Immunotherapy for Advanced Cutaneous Squamous Cell Carcinoma*. *Current Treatment Options in Oncology*, 20(4).
42. In, G. K., Vaidya, P., Filkins, A., Hermel, D. J., King, K. G., Ragab, O., Tseng, W. W., Swanson, M., Kokot, N., Lang, J. E., Menendez, L., DeClerck, B., Kim, G., Hu, J. C., Terando, A., Jadvar, H., Ricker, C., Miller, K. A., Peng, D. H., Wysong, A. (2020). *PD-1 inhibition therapy for advanced cutaneous squamous cell carcinoma: a retrospective analysis from the University of Southern California*. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 147(6), 1803–1811.
43. Ferrarotto, R., Sousa, L. G., Qing, Y., Kaya, D., Stephen, B., Jain, D., Bell, D., Pant, Shubham, P., Tsimberidou, A. M., Janku, F., Blumenschein, G., Glisson, B. S., Ahnert, J. R., Piha-Paul, S. A., Lee, J. J., Wong, M. K., Lu, C., Meric-Bernstam, F., Naing, A. (2021). *Pembrolizumab in Patients with Refractory Cutaneous Squamous Cell Carcinoma: A Phase II Trial*. *Advances in Therapy*, 38(8), 4581–4591.