



INVESTIGAÇÃO

Contribuição para a caracterização da atividade do campo de cancerização cutâneo: aspectos morfométricos, de textura da cromatina, proliferação e apoptose^{☆,☆☆}

Anna Carolina Miola ^{a,b,*}, Mariana Anteghini Castilho ^c,
Juliano Vilaverde Schmitt ^a, Mariangela Esther Alencar Marques ^d
e Helio Amante Miot ^a

^a Departamento de Dermatologia e Radioterapia, Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, Brasil

^b Departamento de Dermatologia, Instituto Lauro de Souza Lima, Bauru, SP, Brasil

^c Departamento de Radiologia e Diagnóstico por Imagem, Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, Brasil

^d Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, Brasil

Recebido em 26 de janeiro de 2019; aceito em 22 de março de 2019

Disponível na Internet em 16 de dezembro de 2019

PALAVRAS-CHAVE

Carcinoma de células escamosas;
Ceratose actínica;
Neoplasias cutâneas

Resumo

Fundamentos: Campo de cancerização cutâneo (CCC) é uma área cutânea com alterações subclínicas decorrentes da exposição solar crônica, com maior predisposição a desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas e neoplásicas. Até o momento, não há parâmetros objetivos bem definidos que possam indicar seu grau de atividade.

Objetivos: Descrever e comparar aspectos morfométricos e expressão de fatores ligados à apoptose e à proliferação celular em queratoses actínicas (QA), epiderme fotoexposta e fotoprotetida.

Métodos: Estudo transversal, com pacientes portadores de queratose actínica nos membros superiores, biopsiados em dois pontos: queratose actínica e região axilar. As biópsias de Q queratose actínica A, área perilesional e axila foram avaliadas por meio de KIN (*keratinocyte intraepithelial neoplasia*), imuno-histoquímica de p53, survivina e Ki67. Foi feita morfometria nuclear das células da camada basal por meio de análise de imagem digital: entropia, área, perímetro, Ra, dimensão fractal, circularidade, intensidade de cor e maior diâmetro.

DOI referente ao artigo:

<https://doi.org/10.1016/j.abd.2019.03.003>

[☆] Como citar este artigo: Miola AC, Castilho MA, Schmitt JV, Marques MEA, Miot HA. Contribution to characterization of the skin field cancerization activity: morphometric, chromatin texture, proliferation, and apoptosis aspects. An Bras Dermatol. 2019;94:698–703.

^{☆☆} Trabalho realizado na Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, Brasil.

* Autor para correspondência.

E-mail: anna.fmrp@yahoo.com.br (A.C. Miola).

Resultados: Foram incluídos 13 pacientes e amostradas 38 queratoses actínicas. Na morfometria, foram analisados 1.039 núcleos, dos quais 228 representavam pele íntegra axilar, 396 das queratoses actínicas e 415 da área perilesional à queratose actínica. Houve diferença significativa ($p < 0,05$) em todas as variáveis testadas para as topografias avaliadas. Identificaram-se correlação significativa entre os elementos morfométricos nucleares, KIN, marcadores de proliferação e apoptose. Padrões conjuntos de p53, Ki67 e KIN discriminaram as topografias amostradas.

Limitações do estudo: Estudo transversal, com pequeno número de pacientes.

Conclusões: Há padrões de proliferação, resistência à apoptose e morfométricos celulares diferentes entre pele fotoprotégida e pele fotoexposta. A expressão conjunta de p53, Ki67 e o KIN pode caracterizar a atividade do campo de cancerização cutâneo.

© 2019 Sociedade Brasileira de Dermatologia. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este é um artigo Open Access sob uma licença CC BY (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Introdução

O conceito de campo de cancerização foi proposto por Slaughter em 1953 e compreende uma área de tegumento aparentemente normal, porém com alterações subclínicas e multifocais, composta por células geneticamente alteradas em decorrência da exposição solar crônica.^{1,2} O conceito de campo de cancerização cutâneo (CCC) sugere que a pele clinicamente normal adjacente às queratoses actínicas (QAs) seja foco de expansão clonal de células geneticamente alteradas, o que explicaria a ocorrência de novas QAs ou outras neoplasias cutâneas em uma mesma área tegumentar, além da recorrência local de tumores considerados completamente excisados pela análise histopatológica.³

Recentemente, o CCC tem sido intensamente estudado devido a sua importância clínica, pois sua estabilização pode prevenir o surgimento de neoplasias, sua recorrência ou a evolução de lesões já existentes.

Atualmente, as QAs, lesões epiteliais pré-neoplásicas são consideradas marcadores de atividade do CCC.⁴ Entretanto, até o momento, não há parâmetros objetivos bem definidos que possam indicar seu grau de atividade.

Determinar a extensão e a intensidade da atividade de um CCC torna-se importante para criar estratégias de tratamento e prevenção diversas e adequadas para cada tipo de paciente, bem como para avaliar a resposta e o prognóstico após a instituição de terapêuticas adequadas.⁵ Survivina, p53 e Ki67 são marcadores nucleares presentes em células proliferativas e expressas em lesões neoplásicas e pré-neoplásicas, que podem auxiliar na caracterização de um CCC em atividade.⁶

A síntese de p53 induz o reparo ao DNA e apoptose. Mutações na p53 são as alterações genéticas mais encontradas em neoplasias do ser humano.⁷ Recentemente, a análise de éxons no gene p53 em tumores do trato aerodigestivo tem demonstrado provável método molecular para detecção de campo de cancerização.⁸ Além disso, mutações na p53 podem ser encontradas em QAs e carcinomas espinocelulares (CEC) na maioria dos casos e em concentrações maiores nos CEC, enquanto pacientes sem lesões suspeitas de câncer não expressam mutações na p53, o que sugere que mutações na p53 podem estar envolvidas na conversão de QAs a CECs e, conseqüentemente, podem indicar atividade do CCC.⁹

O antígeno Ki67 é um marcador de proliferação celular^{10,11} que está correlacionado com crescimento tumoral e potencial metastático.^{12,13} A expressão nuclear de Ki67 foi estudada previamente em neoplasias cutâneas e é evidenciada em QA, doença de Bowen, carcinoma basocelular e CEC.^{14,15} Até o momento, não há estudos que descrevam a expressão de Ki67 na atividade de CCC.

A survivina é uma proteína expressa por queratinócitos proliferativos e pode ser encontrada no citoplasma ou no núcleo,¹⁶ atua tanto na regulação do ciclo celular quanto no controle da apoptose. Sua função varia de acordo com a localização intracelular:¹⁷ enquanto a expressão nuclear está mais associada à divisão celular e é essencial para a mitose, a presença de survivina no citoplasma é considerada citoprotetora.¹⁸ Um alto nível de survivina nuclear é preditivo de maior malignidade ou pior prognóstico quando analisado em tumores epiteliais.¹⁹⁻²² Além disso, a localização da survivina nuclear nas camadas da epiderme também influencia e indica prognóstico: enquanto a presença de survivina na camada basal pode ser encontrada em um epitélio sem alterações, a expressão de survivina nuclear nas camadas suprabasais indica ruptura da homeostase das células epidérmicas e, conseqüentemente, atividade mitótica, pode auxiliar na caracterização do CCC.²³

A análise morfológica nuclear pode fornecer indícios sobre a fisiologia celular e contribuir para a avaliação diagnóstica e prognóstica de lesões neoplásicas. Além disso, alterações na arquitetura da cromatina nuclear podem indicar atividade mitótica intensa e se correlacionar com graus de proliferação neoplásicos. Desse modo, a morfometria e as características de texturas nucleares têm sido estudadas como fatores prognósticos em muitas neoplasias.²⁴⁻²⁷ Investigações sobre morfometria nuclear e heterogeneidade da cromatina foram feitas em CBCs, porém não há estudos que caracterizem tais parâmetros no CCC e os correlacionem com atividade de campo.²⁸

O uso de técnicas morfométricas e imuno-histoquímicas, juntamente com dados clínicos e histopatológicos, pode fornecer informações sobre o comportamento biológico e contribuir para a avaliação da efetividade de tratamentos.

Métodos

Estudo transversal feito com pacientes adultos de ambos os gêneros, com QAs nos membros superiores, biopsiados em dois pontos: pele que engloba uma QA dos membros superiores e outro de pele axilar. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da instituição (CEP) e todos os pacientes incluídos assinaram termo de consentimento livre e esclarecido.

As biópsias de QAs, área perilesional e área fotoprotégida foram analisadas à histopatologia (HE) por meio do método KIN (*keratinocyte intraepithelial neoplasia*). A classificação KIN é um modo de classificar a intensidade da atipia dos queratinócitos por meio de sua presença nos níveis epidérmicos, de maneira que KIN I apresenta atipia focal no terço inferior dos queratinócitos; KIN II apresenta despolarização nas camadas espinhosa-granulosa; e KIN III apresenta despolarização em

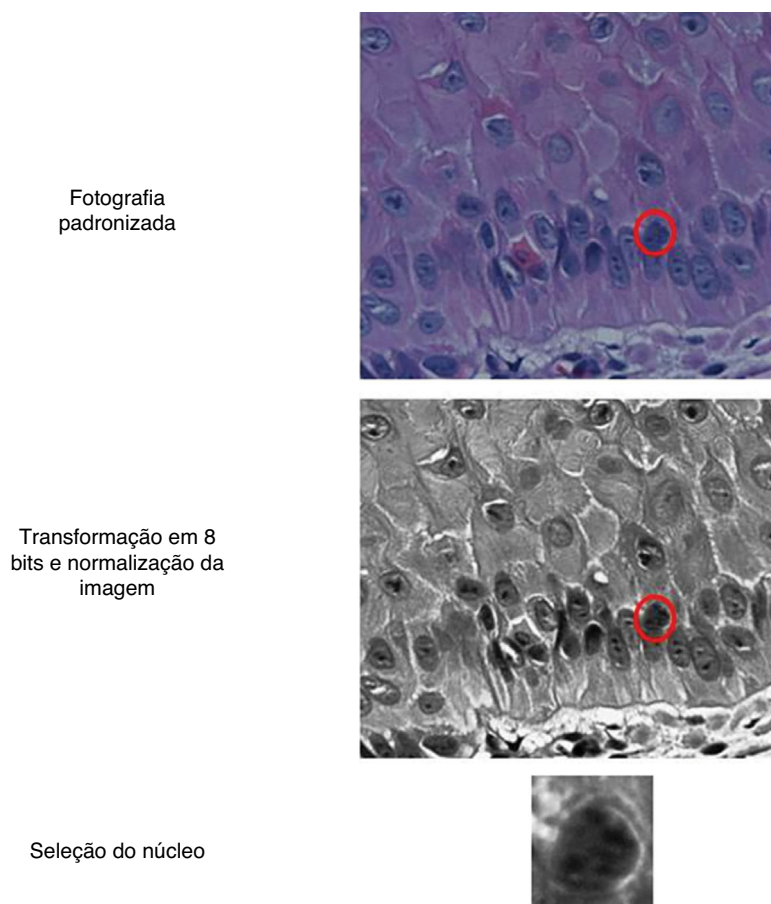


Figura 1 Esquema representativo do preparo das imagens e seleção dos núcleos.

todos os estratos epidérmicos.²⁹ Para fins de análise estatística, a pele normal axilar foi considerada como KIN 0.

À imuno-histoquímica foi analisada de acordo com a porcentagem de células coradas por survivina, p53 e Ki67 nos *hotspots* de QA, áreas perilesionais e axilares.

As lâminas foram fotografadas em alta resolução (400×) com microscópio Coolscope II (Nikon Instruments Inc., Tóquio, Japão, 2009), com registro de cerca de 30 núcleos/campo. Os núcleos da camada basal da epiderme foram recortados manualmente e suas imagens transformadas para 8 bits e normalizadas. Foi usado o *software* ImageJ (fig. 1). As imagens resultantes foram submetidas à extração dos índices de entropia, intensidade da cor, dimensão fractal, Ra, circularidade, perímetro e área.

Quanto à análise estatística, os dados foram comparados entre as topografias pelo teste de Jonckheere-Terpstra. A normalidade foi estimada pelo teste de Shapiro-Wilk.³⁰ As correlações entre os indicadores foram estimadas pelo coeficiente de Spearman e apresentadas como mapa térmico.³¹ Os comportamentos das variáveis foram comparados por análise de correspondência múltipla e dispostos pelo mapa perceptual.³² Foram considerados significativos valores de $p < 0,05$.

Resultados

Foram incluídos 13 pacientes: quatro mulheres e nove homens, de 37 a 88 anos, em que foram amostradas 38 QA.

Na morfometria, foram analisados 1.039 núcleos, dos quais 228 representavam pele íntegra axilar, 396 das QA e 415 da área

perilesional à QA. Os valores médios de das morfometrias estão dispostos na [tabela 1](#).

Houve diferença significativa ($p < 0,05$) nos valores da pele fotoprotetida e fotoexposta em todas as variáveis testadas (p53, Ki67), como observado na [tabela 2](#). Além disso, KIN mostrou-se diretamente relacionada com a fotoexposição, tendeu a zero na pele fotoprotetida (fig. 2).

Identificou-se correlação entre os indicadores morfométricos e de proliferação e apoptose (fig. 3). Os elementos que mais se correlacionaram com o KIN foram o p53 e Ki67. Houve intensa correlação dos elementos morfométricos entre si.

Nenhuma das variáveis testadas destacou-se como marcador individual de atividade do CCC; entretanto, KIN, p53 e Ki67, em conjunto, puderam caracterizar o comportamento das topografias (fig. 4). Houve grande proximidade espacial da QA com KIN III e os maiores valores de Ki67 e p53; a pele fotoexposta teve grande proximidade ao KIN I e valores intermediários dos outros marcadores, enquanto a epiderme axilar apresentou maior proximidade ao KIN 0.

Discussão

O CCC, nesse grupo de amostras, caracterizou-se por maior proliferação epitelial, aumento na expressão de fatores ligados à apoptose e alterações na morfologia nuclear, em concordância com a literatura.^{9,11} Houve progressiva expressão dessas variáveis na pele fotoprotetida em relação à pele fotoexposta e QAs, mostrou que a exposição crônica à radiação ultravioleta

Tabela 1 Valores das variáveis conforme a localização da amostra de pele. Todas as variáveis resultaram em $p < 0,05$

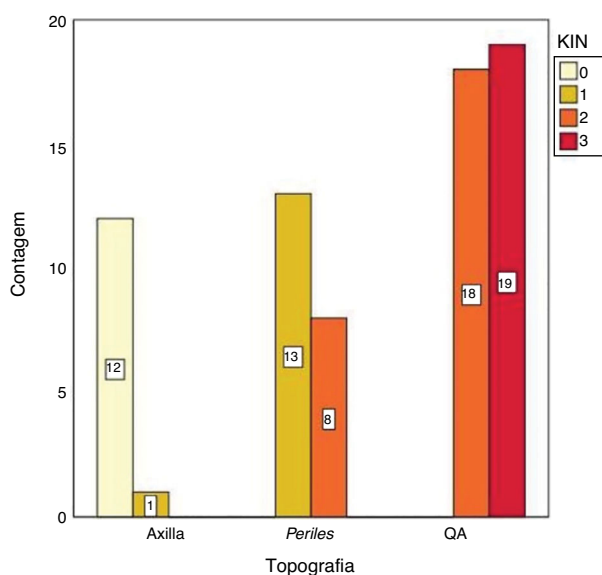
Parâmetros nucleares	Axila	Perilesional	QA
Área	1278,30 (1128,0–1266,62)	1481,57 (1312,56–2070,25)	1823,58 (1420,54–2295,45)
Perímetro	140,98 (135,64–145,06)	157,52 (148,81–209,99)	178,52 (152,27–213,58)
Circularidade	0,81 (0,75–0,84)	0,74 (0,71–0,77)	0,73 (0,69–0,78)
Maior diâmetro	51,69 (48,96–52,45)	56,62 (54,15–69,30)	52,11 (54,17–74,93)
Mediana da cor	33,94 (30,22–35,78)	39,19 (31,59–43,38)	43,64 (36,12–50,24)
Entropia	5,30 (5,17–5,32)	5,26 (5,18–5,35)	5,34 (5,26–5,54)
Ra	1346,55 (988,80–2026,91)	2181,88 (1601,59–7777,78)	3579,69 (1744,43–8115,73)
Dimensão fractal	2,45 (2,44–2,45)	2,46 (2,45–2,48)	2,47 (2,45–2,50)

^a Mediana (p25–75).

Tabela 2 Porcentagem de células que expressam survivina, p53 e Ki67 nas QA, pele fotoexposta e pele fotoprotetida. Todas as variáveis resultaram em $p < 0,05$

Marcadores	Axila	Perilesional	QA
Ki67	18,68 (14,29–26,62)	23,98 (17,59–29,46)	42,07 (35,03–51,61)
Survivina suprabasal	11,58 (6,71–15,50)	18,57 (10,06–28,43)	38,16 (23,22–46,41)
p53	13,81 (5,38–20,12)	23,88 (16,83–37,78)	65,35 (54,64–79,61)

^a Mediana (p25–75).

**Figura 2** Distribuição da avaliação KIN de acordo com a topografia.

promove alterações teciduais no CCC, com correlação entre a expressão desses fatores e o grau de displasia histológica do epitélio.

As associações dos epitélios com a expressão de KIN, p53 e Ki67 modificaram-se proporcionalmente de acordo com a fotoexposição, o que os sugere como fortes candidatos à caracterização do CCC e indicam que podem ser usados na análise de sua atividade em ensaios clínicos terapêuticos e no desenvolvimento de medidas que visem à prevenção do desenvolvimento de cânceres de pele.

Houve, também, aumento de expressão de survivina suprabasal com relação diretamente proporcional ao aumento da

exposição solar e presença de QA, como esperado pela literatura;²³ entretanto, sua correlação com Ki67 e p53, marcadores bem estabelecidos,^{11–14} foi menos intensa (fig. 3). Além disso, ainda são necessários mais estudos de correlação entre a expressão de survivina suprabasal e atividade do CCC para que haja maior nível de evidência desses achados.

Alterações da morfometria nuclear e da textura da cromatina são usadas em patologia como critérios de diferenciação entre tecidos saudáveis e de neoplasias.^{24,31} Além disso, tecidos sob estresse, como a radiação ultravioleta, também podem apresentar alterações nucleares, geralmente relacionadas à intensidade da atividade metabólica.^{24,28} Neste estudo, fenotipicamente, o dano genômico do CCC manifestou-se como variações do formato do núcleo e heterogeneidade da cromatina, correlacionadas entre si e com alterações de caráter progressivo de acordo com a fotoexposição e presença de QAs, subsidiaram as evidências de instabilidade genômica e sugeriram que essas alterações ocorram de maneira simultânea intranuclear.

As principais limitações do estudo referem-se à pequena quantidade de participantes, apesar de possibilitarem um número suficiente de lesões para análise. Como o estudo é transversal, embora QAs e CCC sejam entidades instáveis, um desenho longitudinal poderia fornecer elementos mais consistentes de sua atividade ligadas ao prognóstico oncológico.^{33,34}

A caracterização histológica do CCC deve oferecer subsídios adicionais à contagem de QAs e às escalas de qualidade de vida e aos escores clínicos de gravidade^{4,35,36} na compreensão dos fenômenos subjacente ao CCC. Esses achados estão sendo testados em ensaios clínicos com tratamentos de campo de cancerização, como terapia fotodinâmica,³⁷ mebutato de ingenol e 5-fluorouracil, assim como de acordo com uma escala de gravidade de QAs, em desenvolvimento por nosso grupo de estudo em CCC.

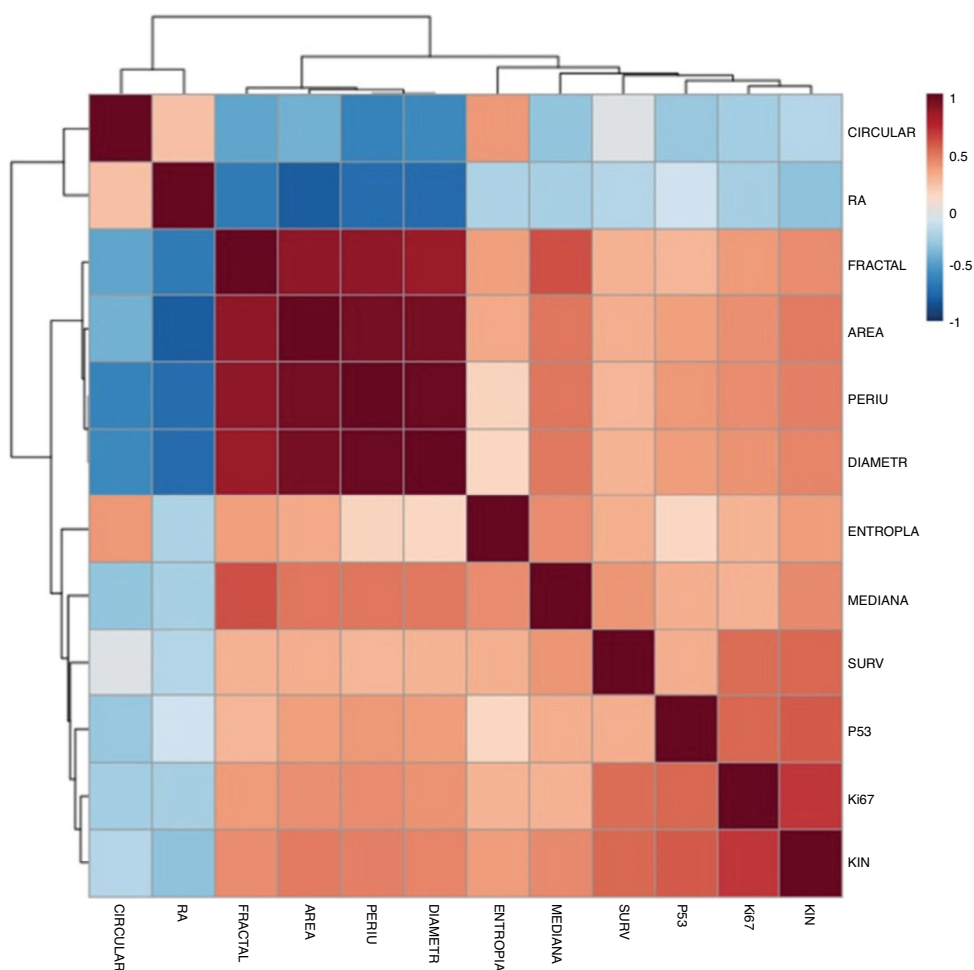


Figura 3 Mapa térmico das correlações (Spearman) entre os indicadores morfométricos e relacionados à apoptose e proliferação. Todas as correlações resultaram em $p < 0,05$.

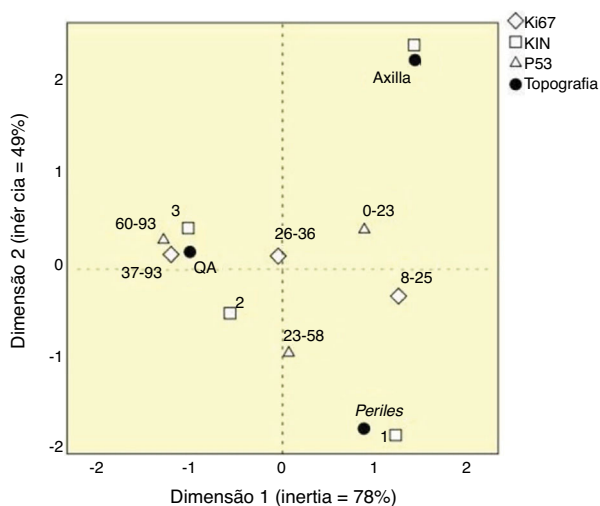


Figura 4 Mapa perceptual da distribuição de p53, Ki67 e KIN de acordo com a topografia.

Conclusão

Variáveis morfométricas e relativas à textura da cromatina apresentaram diferença na comparação da pele fotoexposta e

fotoprotetida. KIN, p53 e Ki67 – conjuntamente – tornaram possível a caracterização do CCC.

Suporte financeiro

Nenhum.

Contribuição dos autores

Anna Carolina Miola: Aprovação da versão final do manuscrito; Elaboração e redação do manuscrito; Obtenção, análise e interpretação dos dados; Revisão crítica da literatura

Mariana Anteghini Castilho: Aprovação da versão final do manuscrito; concepção e planejamento do estudo; obtenção, análise e interpretação dos dados.

Juliano Vilaverde Schmitt: Aprovação da versão final do manuscrito; obtenção, análise e interpretação dos dados; participação efetiva na orientação da pesquisa; participação intelectual em conduta propedêutica e/ou terapêutica de casos estudados; revisão crítica da literatura; revisão crítica do manuscrito.

Mariangela Esther Alencar Marques: Aprovação da versão final do manuscrito; revisão crítica do manuscrito.

Helio Amante Miot: Análise estatística; aprovação da versão final do manuscrito; participação efetiva na orientação da pesquisa; participação intelectual em conduta propedêutica e/ou terapêutica de casos estudados; revisão crítica da literatura.

Conflitos de interesse

Nenhum.

Referências

- Slaughter DP, Southwick HW, Smejkal W. Field cancerization in oral stratified squamous epithelium; clinical implications of multicentric origin. *Cancer*. 1953;6:963–8.
- Figueras Nart I, Cerio R, Dirschka T, Dréno B, Lear JT, Pellacani G, et al. Defining the actinic keratosis field: a literature review and discussion. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2018;32:544–63.
- Torezan LA, Festa-Neto C. Cutaneous field cancerization: clinical, histopathological and therapeutic aspects. *An Bras Dermatol*. 2013;88:775–86.
- Ianhez M, Fleury Junior LF, Bagatin E, Miot HA. The reliability of counting actinic keratosis. *Arch Dermatol Res*. 2013;305:841–4.
- Gracia Cazaña T, Salazar N, Vera-Álvarez J, González S, Juarranz A, Gilaberte Y. Comparative study of the clinical, histological, and biological characteristics of squamous cell carcinomas in areas previously treated with photodynamic therapy. *Eur J Dermatol*. 2017;27:627–34.
- Dornelas MT, Rodrigues MF, Machado DC, Gollner AM, Ferreira AP. Expression of cell proliferation and apoptosis biomarkers in skin spinocellular carcinoma and actinic keratosis. *An Bras Dermatol*. 2009;84:469–75.
- Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. p53 mutations in human cancers. *Science*. 1991;253:49–53.
- Chung KY, Mukhopadhyay T, Kim J, Casson A, Ro JY, Goepfert H, et al. Discordant p53 gene mutations in primary head and neck cancers and corresponding second primary cancers of the upper aerodigestive tract. *Cancer Res*. 1993;53:1676–83.
- Nelson MA, Einspahr JG, Alberts DS, Balfour CA, Wymer JA, Welch KL, et al. Analysis of the p53 gene in human precancerous actinic keratosis lesions and squamous cell cancers. *Cancer Lett*. 1994;85:23–9.
- Stratigos AJ, Kapranos N, Petrakou E, Anastasiadou A, Pagouni A, Christofidou E, et al. Immunophenotypic analysis of the p53 gene in non-melanoma skin cancer and correlation with apoptosis and cell proliferation. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2005;19:180–6.
- Brown DC, Gatter KC. Monoclonal antibody Ki-67: its use in histopathology. *Histopathology*. 1990;17:489–503.
- Batinac T, Zamolo G, Jonjić N, Gruber F, Petrovecki M. p53 protein expression and cell proliferation in non-neoplastic and neoplastic proliferative skin diseases. *Tumori*. 2004;90:120–7.
- Väisänen A, Kuvaja P, Kallioinen M, Turpeenniemi-Hujanen T. A prognostic index in skin melanoma through the combination of matrix metalloproteinase-2 Ki67, and p53. *Hum Pathol*. 2011;42:1103–11.
- Marinescu A, Stepan AE, Mărgăritescu C, Marinescu AM, Zăvoi RE, Simionescu CE, et al. P53, p16 and Ki67 immunorexpression in cutaneous squamous cell carcinoma and its precursor lesions. *Rom J Morphol Embryol*. 2016;57 Suppl:691–6.
- Talghini S, Halimi M, Baybordi H. Expression of P27 Ki67 and P53 in squamous cell carcinoma, actinic keratosis and Bowen disease. *Pak J Biol Sci*. 2009;12:929–33.
- Marconi A, Dallaglio K, Lotti R, Vaschieri C, Truzzi F, Fantini F, et al. Survivin identifies keratinocyte stem cells and is down-regulated by anti-beta1 integrin during anoikis. *Stem Cells*. 2007;25:149–55.
- Colnaghi R, Connell CM, Barrett RM, Wheatley SP. Separating the anti-apoptotic and mitotic roles of survivin. *J Biol Chem*. 2006;281:33450–6.
- Dohi T, Beltrami E, Wall NR, Plescia J, Altieri DC. Mitochondrial survivin inhibits apoptosis and promotes tumorigenesis. *J Clin Invest*. 2004;114:1117–27.
- Breyer J, Gierth M, Shalekenov S, Aziz A, Schäfer J, Burger M, et al. Epithelial-mesenchymal transformation markers E-cadherin and survivin predict progression of stage pTa urothelial bladder carcinoma. *World J Urol*. 2016;34:709–16.
- Xie S, Xu H, Shan X, Liu B, Wang K, Cai Z. Clinicopathological and prognostic significance of survivin expression in patients with oral squamous cell carcinoma: evidence from a meta-analysis. *PLoS One*. 2015;10:e0116517.
- Jin Y, Chen J, Feng Z, Fan W, Wang Y, Li J, et al. The expression of Survivin and NF-κB associated with prognostically worse clinicopathologic variables in hepatocellular carcinoma. *Tumour Biol*. 2014;35:9905–10.
- Malhotra U, Zaidi AH, Kosovec JE, Kasi PM, Komatsu Y, Rotoloni CL, et al. Prognostic value and targeted inhibition of survivin expression in esophageal adenocarcinoma and cancer-adjacent squamous epithelium. *PLoS One*. 2013;8:e78343.
- Dallaglio K, Petrachi T, Marconi A, Truzzi F, Lotti R, Saltari A, et al. Expression of nuclear survivin in normal skin and squamous cell carcinoma: a possible role in tumour invasion. *Br J Cancer*. 2014;110:199–207.
- Metze K. Fractal dimension of chromatin: potential molecular diagnostic applications for cancer prognosis. *Expert Rev Mol Diagn*. 2013;13:719–35.
- Adam RL, Silva RC, Pereira FG, Leite NJ, Lorand-Metze I, Metze K. The fractal dimension of the nuclear chromatin as a prognostic factor in acute precursor B lymphoblastic leukemia. *Cell Oncol*. 2006;28:55–9.
- Bedin V, Adam RL, de Sá BC, Landman G, Metze K. Research article Fractal dimension of chromatin is an independent prognostic factor for survival in melanoma. *BMC Cancer*. 2010;10:260.
- Brianezi G, Handel AC, Schmitt JV, Miot LD, Miot HA. Changes in nuclear morphology and chromatin texture of basal keratinocytes in melasma. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2015;29:809–12.
- Mendaçolli PJ, Brianezi G, Schmitt JV, Marques MEA, Miot HA. Nuclear morphometry and chromatin textural characteristics of basal cell carcinoma. *An Bras Dermatol*. 2015;90:874–8.
- Anwar J, Wrone DA, Kimyai-Asadi A, Alam M. The development of actinic keratosis into invasive squamous cell carcinoma: evidence and evolving classification schemes. *Clin Dermatol*. 2004;22:189–96.
- Miot HA. Assessing normality of data in clinical and experimental trials. *J Vasc Bras*. 2017;16:88–91.
- Miot HA. Correlation analysis in clinical and experimental studies. *J Vasc Bras*. 2018;17:275–9.
- Sourial N, Wolfson C, Zhu B, Quail J, Fletcher J, Karunanathan S, et al. Correspondence analysis is a useful tool to uncover the relationships among categorical variables. *J Clin Epidemiol*. 2010;63:638–46.
- Schmitt JV, Miot HA. Actinic keratosis: a clinical and epidemiological revision. *An Bras Dermatol*. 2012;87:425–34.
- Ianhez M, Miot HA, Bagatin E. Liquid nitrogen for the treatment of actinic keratosis: a longitudinal assessment. *Cryobiology*. 2014;69:140–3.
- Esmann S, Vinding GR, Christensen KB, Jemec GB. Assessing the influence of actinic keratosis on patients' quality of life: the AKQoL questionnaire. *Br J Dermatol*. 2013;168:277–83.
- Dréno B, Cerio R, Dirschka T, Nart IF, Lear JT, Peris K, et al. A Novel Actinic Keratosis Field Assessment Scale for Grading Actinic Keratosis Disease Severity. *Acta Derm Venereol*. 2017;97:1108–13.
- Miola AC, Ferreira ER, Lima TRR, Schmitt JV, Abbade LPF, Miot HA. Effectiveness and safety of 0.5% colchicine cream vs. photodynamic therapy with methyl aminolaevulinate in the treatment of actinic keratosis and skin field cancerization of the forearms: a randomized controlled trial. *Br J Dermatol*. 2018;179:1081–7.