

Expresión de la proteína p63 como marcador pronóstico de recidiva en carcinomas epidermoide y basocelular cutáneos

Drs. Wilfredo Perfetti-Girón¹, Aldo Reigosa², Daniel Verdecchia¹, Wilfredo Perfetti-Cavaliere¹, Graciela Nicita², Mai Lyng Hung², Ángel Fernández^{2,3}

RESUMEN

Introducción: El p63 es una proteína que se expresa ampliamente en tejidos humanos, particularmente en las células basales de muchos tejidos epiteliales. Su actividad en la transcripción de información de los procesos de proliferación celular, plantea la hipótesis de que el p63 pudiera jugar un papel importante en los procesos de carcinogénesis. **Objetivo:** Relacionar el porcentaje de expresión inmunohistoquímica del p63 con la aparición de recidiva tumoral en carcinomas cutáneos de células escamosas (CCE) y basocelular (CBC). **Métodos:** El estudio se realizó en 34 pacientes con cáncer de piel en seguimiento en el Servicio de Cabeza y Cuello del Instituto de Oncología “Dr. Miguel Pérez Carreño” (IOMPC) de Valencia, Venezuela entre los años 2006 al 2016. **Resultados:** En el estudio del intervalo libre de enfermedad (ILE), se observó un pronóstico favorable en los tumores cuya expresión de la proteína fue mayor al 50 % en comparación del ILE obtenido con un p63 menor al 50 %, aunque con una $p=0,212$. No obstante, una expresión de p63 menor al 40 % se asoció a un ILE inferior y por ende a un peor pronóstico o a una recidiva, con significancia estadística ($p=0,030$). Finalmente, en los CCE hubo una asociación a recaídas en los tumores cuya expresión de la proteína fue menor al 60 % ($p=0,038$). **Conclusión:** El porcentaje de células positivas al p63 pudiera tener importancia pronóstica en la predicción

de recidivas para los carcinomas basocelulares y de células escamosas cutáneos.

Palabras clave: p63, carcinoma basocelular, carcinoma epidermoide, recidiva tumoral.

SUMMARY

Introduction: p63 is a protein that is widely expressed in human tissues, particularly in the basal cells of many epithelial tissues. Its activity in the transcription of information on cell proliferation processes raises the hypothesis that p63 could play an important role in carcinogenesis processes. **Objective:** To relate the percentage of immunohistochemical expression of p63 with the appearance of tumor recurrence in cutaneous squamous cell carcinomas (SCC) and basal cell carcinomas (CBC). **Methods:** The study was conducted in 34 patients with skin cancer in follow-up at the Head and Neck Service of the “Dr. Miguel Pérez Carreño” Oncology Institute (IOMPC) in Valencia, Venezuela between 2006 and 2016. **Results:** In the study of the disease-free interval (ILE), a favorable prognosis was observed in tumors whose protein expression was greater than 50 % compared to the ILE obtained with a p63 less than 50 %, although with a $p=0.212$. However, an expression of p63 less than 40 % was associated with a lower ILE and therefore a worse prognosis or a relapse, with statistical significance ($p=0.030$). Finally, in the SCC there was an association with relapses in tumors whose protein expression was less than 60 % ($p=0.038$).

¹Instituto de Oncología “Dr. Miguel Pérez Carreño”, Valencia, Venezuela.

²Centro de Investigaciones Médicas y Biotecnológicas de la Universidad de Carabobo, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo, Valencia, Venezuela.

³Departamento de Ciencias Fisiológicas, Escuela de Ciencias Biomédicas y Tecnológicas, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo, Valencia, Venezuela.

Autor de correspondencia: Ángel Fernández. Correo electrónico: aafernandez@uc.edu.ve. Teléfono celular: +58-0241-8666243.

Conclusion: *The percentage of cells positive to p63 could have prognostic importance in the prediction of relapses for basal cell and squamous cell carcinomas.*

Key words: *p63, basal cell carcinoma, squamous cell carcinoma, tumor recurrence.*

Conflicto de interés: Los autores declaran la inexistencia de conflictos de interés.

El presente trabajo cuenta con la aprobación del Comité de Ética y la Comisión de Investigación del Instituto de Oncología “Dr. Miguel Pérez Carreño”.

INTRODUCCIÓN

Los carcinomas basocelulares (CBC) y los carcinomas de células escamosas (CCE), también llamados carcinomas epidermoides, son las formas más frecuentes de cáncer de piel y, en conjunto, se los denomina cánceres de piel no melanoma (CPNM). El CPNM es el de mayor incidencia y el CBC representa cerca de tres cuartos de los CPNM a nivel mundial (1-3). En Venezuela, no existen datos oficiales sobre la incidencia y mortalidad de estos tipos de cáncer según el último anuario del Ministerio del Poder Popular para la Salud del año 2013 (4).

El CBC es un tumor de invasión local y crecimiento lento, que rara vez produce metástasis, cuyo origen son las células epidérmicas de los folículos pilosos o las células basales de la epidermis. Por su parte, el CCE es la segunda neoplasia cutánea más común después del CBC y se estima que alrededor de un 5 % presentan metástasis locales y a distancia, debido a que tiende a crecer y diseminarse más rápidamente (5-8). Se origina en las células planas superficiales (suprabasales) de la epidermis. En la actualidad, se conoce que el principal factor de riesgo para el desarrollo de CCE y CBC es la exposición crónica a la luz solar, principalmente a los rayos ultravioleta (9-13). Aunque la mayoría de estos dos tipos de tumores se resuelven con cirugía, una vez que se diagnostican por primera vez, el riesgo de que aparezca una nueva lesión se incrementa considerablemente, por lo tanto, la determinación de una posible recidiva es de vital importancia (13,14).

El desarrollo de estos tumores se relaciona principalmente con los factores de transcripción (FT) p53, activador de la proteína-1 (AP-1) y factor nuclear kappa B (NF-kB). Las mutaciones o expresiones aberrantes de estos FT, contribuye directa o indirectamente a algunas de las características de los CPNM, incluyendo la insensibilidad a las señales de proliferación o apoptosis, las señales de crecimiento por retroalimentación, la angiogénesis sostenida y la ilimitada capacidad de replicación e invasión o metástasis. Todos estos mecanismos contribuyen al desarrollo de cáncer de piel (14-16).

Cabe destacar, que los estudios del comportamiento genético de estos tipos de cáncer han sido ampliamente estudiados y actualmente, se han identifican nuevas vías de proliferación celular con nuevos genes involucrados, como por ejemplo, el gen p63. El p63 es un miembro de la familia del gen p53, que se encuentra en el cromosoma humano 3q27-29 (17-19). Codifica una proteína que se expresa en tejidos humanos y murinos, particularmente en las células basales de muchos epitelios como en el cuello uterino, uretra y próstata. Asimismo, la proteína p63 juega un papel importante en el desarrollo del epitelio estratificado de la epidermis. La localización predominante de p63 en la capa basal de los epitelios escamosos estratificados, es interesante ya que estas células actúan como los progenitores de las células suprabasales, que se someten a la diferenciación y la muerte celular en el epitelio regenerativo (20-22).

Su actividad en la transcripción de información de los procesos de proliferación celular, nos hace plantear la hipótesis que el p63 pudiera jugar un papel importante en los procesos de recidiva tumoral (21,22), de allí la importancia de evaluar sus funciones y las consecuencia que tienen sus alteraciones e interacciones con otros genes involucrados en la carcinogénesis. Considerando que no existen referencias nacionales sobre la expresión de este marcador en carcinomas escamosos y basocelulares, los resultados de la expresión inmunohistoquímica de la proteína aportarán datos importantes sobre el conocimiento de esta enfermedad y, en particular, el papel que juega la expresión de p63 en la recaída del CPNM en Venezuela.

MÉTODO

El presente estudio se realizó en pacientes con diagnóstico de CBC y CCE cutáneos que fueron tratados en el Servicio de Cabeza y Cuello del Instituto de Oncología “Dr. Miguel Pérez Carreño” (IOMPC) en el año 2006, con seguimiento hasta el año 2016. Se conformó una serie no aleatoria, de tipo intencional, con 34 pacientes que incluían casos con recidiva o sin recidiva de la enfermedad (grupo control). Los datos de interés para la investigación se tomaron de los que figuran en la historia clínica de cada paciente. Los pacientes fueron tratados quirúrgicamente con resecciones suficientes, obteniéndose en todos los casos bordes quirúrgicos libres de infiltración neoplásica, con márgenes adecuados según cada caso. Finalmente, fueron recolectados los bloques de parafina y las preparaciones histológicas correspondientes al diagnóstico inicial, verificándose su integridad y la suficiencia del material neoplásico.

Construcción de la matriz de tejidos. Las muestras tisulares se fijaron en formol y se incluyeron en parafina siguiendo los métodos convencionales. De los bloques de parafina se obtuvieron secciones histológicas de 4 μ m de espesor que, posteriormente, se tiñeron con hematoxilina-eosina. Se revisaron las preparaciones histológicas y se seleccionaron cuidadosamente las zonas con tumor, marcando esas mismas áreas en el bloque de parafina, a fin de construir las matrices de tejido según lo descrito en la literatura (23).

Inmunohistoquímica. Se utilizó el método inmunohistoquímico de la estreptavidina biotina-peroxidasa, del sistema Immunon de DakoCytomation® según el protocolo indicado por la casa comercial. Una vez terminada la recuperación antigénica, se realizó la incubación con el anticuerpo primario. Las muestras se lavaron con tampón fosfato salino y se añadió el anticuerpo secundario conjugado. Por último, el revelado de la reacción se realizó con la aplicación del cromógeno diaminobencidina. Finalmente, se llevó a cabo la contra tinción de las secciones tisulares con hematoxilina (23).

Interpretación de los resultados del estudio inmunohistoquímico. Se analizó la inmunotinción del tejido neoplásico y de la piel

circundante normal (incluyendo sus anexos) para así establecer el patrón de expresión de p63. En cuanto a las células neoplásicas, se consideró como patrón de inmunotinción negativo, al porcentaje de tinción nuclear “cero” en células malignas. Por su parte, en los casos positivos se registró el porcentaje de inmunotinción en diferentes patrones: no marcaje o marcaje leve (<5%); intermedio (≥ 5 a 50 %) y alto (>50 %), estableciendo adicionalmente diferentes puntos de cortes para relacionarlos con el intervalo libre de enfermedad (ILE). Se estableció el ILE al tiempo transcurrido desde que se realizó el tratamiento quirúrgico con criterios oncológicos para su resección, hasta su recidiva.

Análisis estadístico. El análisis de los datos recogidos se realizó mediante el paquete estadístico SPSS (*Statistical Package for Social Sciences*, versión 22). Los resultados se expresaron como media en el caso de variables cuantitativas y como número absoluto y porcentaje en las cualitativas. La asociación entre las variables clínico-patológicas y el marcador inmunohistoquímico se analizó con la prueba de Chi cuadrado y el test exacto de Fisher. El estudio del ILE se realizó mediante el método de Kaplan-Meier. Se consideraron significativos valores de $P < 0,05$.

RESULTADOS

Los pacientes presentaron un promedio de edad de 65,2 años (32-86, rango 54 años). El sexo masculino fue el de mayor frecuencia con un 79,4 % (27 pacientes), los restantes correspondieron al sexo femenino (7 pacientes, 20,6 %). De ellos, 16 presentaron CBC, representando un 47,1 % y 18 (52,9 %) con CCE. El control y seguimiento de estos pacientes fue de 10 años. De los 34 pacientes estudiados, 11 de ellos presentaron recidiva de su enfermedad, predominantemente en el sexo masculino 90,9 %.

Por su parte, 7 pacientes (63,6 %) con recidiva fueron CCE y 4 (36,4 %) CBC (Cuadro 1). Se observaron 9 pacientes (81,8 %) con recaída antes de los 5 años y 2 (18,2 %) después de los 5 años; uno de ellos con CCE y el otro afectado por un CBC. El marcaje de p63 fue positivo en el 97,0 %, 33 de las 34 muestras estudiadas.

PROTEÍNA P63 COMO MARCADOR PRONÓSTICO DE RECIDIVA EN CARCINOMAS CUTÁNEOS

Cuadro 1
Recidivas en carcinomas cutáneos de células escamosas y basocelular

Recidiva	Tipo de carcinoma n (%)		Total
	Células escamosas	Basocelular	
Si	7 (63,6)	4 (36,4)	11 (32,4)
No	11 (47,8)	12 (52,2)	23 (67,6)
Total	18 (52,9)	16 (47,1)	34 (100)

P=0,529

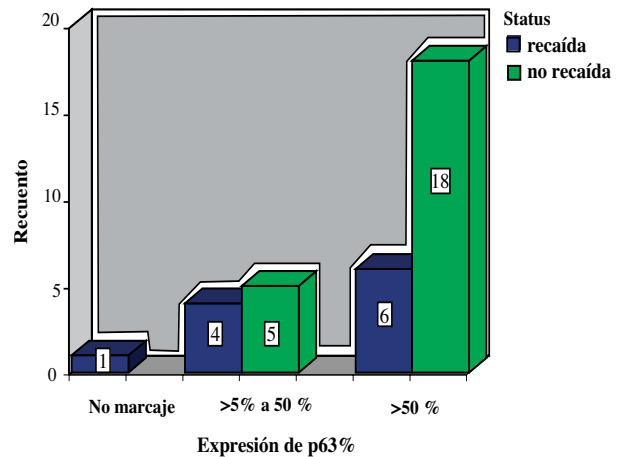


Figura 1. Expresión de p63 y recidivas en carcinomas cutáneos de células escamosas y basocelular.

En el Cuadro 2, se evidencia como el patrón de expresión “alto” fue el más frecuente, tanto para los CCE como para los CBC.

Aunque la mayoría de las recaídas se hallaron cuando la expresión del p63 fue >50 %, ninguna mostró relevancia estadística (Figura 1). En el

Cuadro 2
Porcentaje de expresión de la proteína p63 en carcinomas cutáneos de células escamosas y basocelular

Expresión de p63	Tipo de carcinoma		Total	
	Células escamosas	Basocelular		
No marcaje o leve <5%	Frecuencia	1	0	1
	Expresión de p63	100 %1	0%1	100%
	Tipo histológico	5,6 %2	0%2	2,9%
	Total	2,9 %3	0%3	2,9%
Intermedio ≥5% a 50%	Frecuencia	6	3	9
	Expresión de p63	66,7 %1	33,3 %1	100 %
	Tipo histológico	33,3 %2	18,8 %2	26,5 %
	Total	17,6 %3	8,8 %3	26,5 %
Alto >50%	Frecuencia	11	13	24
	Expresión de p63	45,8 %1	54,2 %1	100 %
	Tipo histológico	61,1 %2	81,2 %2	70,6 %
	Total	32,4 %3	38,2 %3	70,6 %
Total	Frecuencia	18	16	34
	Expresión de p63	52,9 %1	47,1 %1	100 %
	Tipo histológico	100 %2	100 %2	100 %
	Total	52,9 %3	47,1 %3	100 %

1= % con respecto al total horizontal; 2= % con respecto al total vertical; 3= % con respecto al total de todos los casos.

estudio del intervalo libre de enfermedad (ILE), se observó un pronóstico favorable en los tumores cuya expresión de la proteína fue mayor al 50 % en comparación del ILE obtenido con un p63 menor al 50 %, aunque con una $p=0,212$ (Figura 2). Sin embargo, al analizar los diferentes puntos de cortes en relación con el ILE se evidenció un aumento de éste en los casos cuyos tumores tenían una expresión de p63 mayor al 40 %, por el contrario, el p63 menor al 40 % se asoció a un ILE inferior y por ende a un peor pronóstico o una recidiva, con significancia estadística ($P=0,030$) (Figura 3). Finalmente, sólo en el caso de los

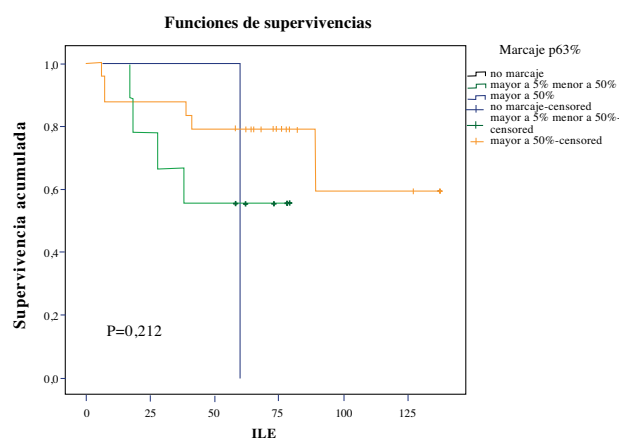


Figura 2. Relación de la expresión de p63 con la aparición de recidiva en carcinomas cutáneos de células escamosas y basocelular.

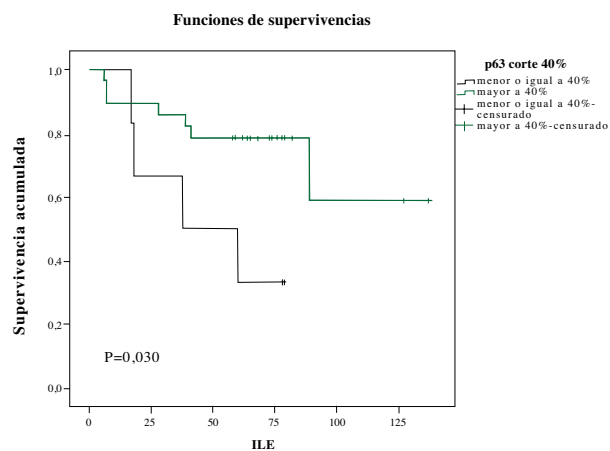


Figura 3. Punto de corte de p63 en 40 % en relación con el ILE en carcinomas cutáneos de células escamosas y basocelular.

CCE el punto de corte en 60 % tuvo significancia estadística ($P=0,038$) y una asociación a recaídas en los tumores cuya expresión de la proteína fue menor al 60 % (Figura 4).

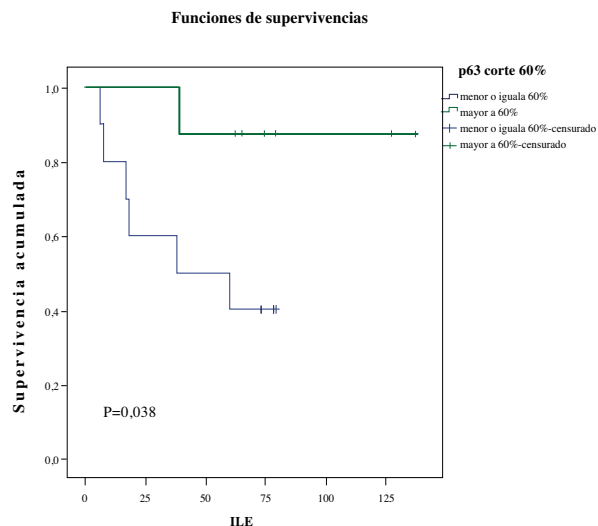


Figura 4. Punto de corte de p63 en 60 % en relación con el ILE en carcinomas cutáneos de células escamosas.

DISCUSIÓN

A nivel mundial, los carcinomas cutáneos presentan bajo índice de mortalidad, siendo su principal problema las recaídas y su morbilidad asociada. Cabe destacar, que el porcentaje de CPNM que recidivan también es generalmente bajo, siendo mayor para los CCE que para los CBC (8,24-26). Los casos recurrentes se han asociado a parámetros tales como el tamaño y la profundidad de la lesión, así como a la obtención de márgenes inadecuados en la resección quirúrgica. Sin embargo, algunos casos reaparecen sin tener alguno de estos factores pronósticos clásicos (9,27-29).

Considerando que la p63 se expresa consistentemente en las células basales de la epidermis y los apéndices cutáneos, en esta investigación se analizó la expresión de la proteína, como un marcador que pudiera ser útil en la selección de pacientes con riesgo de

recidiva, con el fin de establecer un seguimiento más exhaustivo en los afectados con un CPNM (30-33). En base a los hallazgos de este trabajo, el balance de probabilidades está a favor de que la proteína pudiera Figura 3. Punto de corte de p63 en 40 % en relación con el ILE en carcinomas cutáneos de células escamosas y basocelular. desempeñar un papel en el patrón de diferenciación y en la oncogénesis de los carcinomas habituales de la piel, lo cual coincide con otras investigaciones (33-35).

Sin embargo, debido a la complejidad de las isoformas de la proteína, ha sido difícil determinar sus funciones exactas en términos de potenciar o bloquear la proliferación celular (36-38). Mientras que rara vez se ha descrito la mutación del gen, la proteína se desregula con frecuencia en los cánceres humanos. Por ejemplo, el p63 es ahora reconocido como un mediador esencial en el desarrollo y modulación de la homeostasis de varios tejidos, entre ellos el cutáneo (35-39).

En este trabajo se encontraron hallazgos interesantes y que vale la pena destacar. En primer lugar se corroboró que el p63 se expresa tanto en los CCE como en los CBC, encontrándose que en ambos su expresión es similar, sin diferencias en cuanto al porcentaje de células positivas, ni al patrón de expresión, lo cual coincide con algunas referencias internacionales (40-43). Por otra parte, y a pesar de las limitaciones en el número de casos analizados, se encontró que en ambos tumores con expresión de p63 menor al 40 %, presentaron una mayor frecuencia de recidivas, al igual que para los CCE pero con una expresión inferior al 60 %, ambos con significancia estadística y similar a lo reportado en la literatura (43,44).

En esta investigación, la alta expresión de p63 en varios casos se relacionó con mal pronóstico, al igual que otros trabajos relacionados a nivel internacional (9,12,44-46), en donde destacan que tal asociación es más fuerte en los pacientes cuyos tumores poseen una mutación en el gen p53, lo cual le confiere al tumor una resistencia a la quimioterapia y revela un nuevo papel oncogénico de ambas proteínas, ya que pueden convertirse en dianas que permitirían sensibilizar las células neoplásicas ante posibles nuevos agentes quimioterapéuticos (47). De igual forma, en otros estudios publicados se ha encontrado valor pronóstico a la expresión de la proteína,

aunque han diferido en los puntos de corte de expresión de p63 con significancia en la evolución de los pacientes (48,49).

Las diversas investigaciones en curso sobre el p63 están abriendo nuevos horizontes para la comprensión y comportamiento de los cánceres en general. En este trabajo se encontraron algunos hallazgos preliminares e inéditos en Venezuela, que deberán ser corroborados con un mayor número de casos y en trabajos prospectivos.

AGRADECIMIENTOS

A todo el personal que labora en el Servicio de Cabeza y Cuello, Anatomía Patológica e Historias Médicas del IOMPC y a la histotecnóloga Lisbeth Silva encargada de la realización de las matrices de tejidos.

REFERENCIAS

1. Reszko A, Aasi SZ, Wilson LD. Cancer of the skin. Principles and Practice of Oncology. 9ª edición. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2011.
2. Athas WF, Hunt WC, Key CR. Changes in nonmelanoma skin cancer incidence between 1977-1978 and 1998-1999 in Northcentral New Mexico. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2003;2:1105-1108.
3. Harris RB, Griffith K, Moon TE. Trends in the incidence of nonmelanoma skin cancers in southeastern Arizona. *J Am Acad Dermatol.* 2001;45:528-536.
4. Ministerio del Poder Popular para la Salud. Anuario de mortalidad 2013. Venezuela. Diciembre 2015. [Documento en línea, consultado en Julio 2017]. Disponible en: <https://www.ovsalud.org/descargas/publicaciones/documentos-oficiales/Anuario-Mortalidad-2013.pdf>.
5. Rogers HW, Weinstock MA, Harris AR, Hinckley MR, Feldman SR, Fleischer AB, et al. Incidence estimate of nonmelanoma skin cancer in the United States. *Arch Dermatol.* 2006;146:283-287.
6. American Cancer Society: Cancer Facts and Figures 2006. [Documento en línea, consultado en Marzo 2017]. Disponible en: <https://old.cancer.org/acs/groups/content/@nho/documents/document/caff2006pwsecuredpdf.pdf>.
7. Karia PS, Han J, Schmults CD. Cutaneous squamous cell carcinoma: Estimated incidence of disease, nodal metastasis, and deaths from disease in the United

- States. *J Am Acad Dermatol.* 2012;68:957-966.
8. Kramer E, Herman O, Frand J, Leibou L, Schreiber L, Vaknine H. Ki67 as a Biologic Marker of Basal Cell Carcinoma: A Retrospective Study. *IMAJ* 2014;16:229-232.
 9. Chren MM, Linos E, Torres JS, Stuart SE, Parvataneni R, Boscardin WJ. Tumor recurrence five years after treatment of cutaneous basal cell carcinoma and squamous cell carcinoma. *J Investigative Dermatol.* 2013;133:1188-1196.
 10. Koster MI, Kim S, Roop DR. P63 deficiency: A failure of lineage commitment or stem cell maintenance? *J Investig Dermatol Symp Proc.* 2005;10:118-123.
 11. Yang A, Kaghad M, Wang Y, Gillett E, Fleming MD, Dötsch V, et al. p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing and dominant-negative activities. *Mol Cell.* 1998;2:305-316.
 12. Suarez-Carmona M, Hubert P, González A, Duray A. Δ Np63 isoform-mediated β -defensin family up-regulation is associated with (lymph) angiogenesis and poor prognosis in patients with squamous cell carcinoma. *Oncotarget.* 2014;5:1856-1868.
 13. Dötsch V, Bernassola F, Coutandin D, Candi E, Melino G. p63 and p73, the ancestors of p53. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010;2:a004887.
 14. Shalini V, Anne S. Chang Advanced Basal Cell Carcinoma: Epidemiology and Therapeutic Innovations. *Curr Dermatol Rep.* 2014;3:40-45.
 15. Mackiewicz M, Bowszyc M, Strzeleckar D, Dańczak A, Adamski Z. Basal cell carcinoma diagnosis. *Contemp Oncol.* 2013;17: 337-342.
 16. Matthew J, Yan Pan, John W. Dermoscopic characteristics of nodular squamous cell carcinoma and keratoacanthoma. *Dermatol Pract Concept.* 2014;4:9-15.
 17. Yuan Y, Duff M, Shiyong W. Retrospective chart of skin cancer presence in the wide excisions. *World J Clin Cases.* 2014;2:5256.
 18. Nuño A, Vicente F, Pinedo F, López JL. Carcinoma epidermoide cutáneo de alto riesgo. *Actas Dermo-Sifiliográficas.* 2012;103:567-578.
 19. Goepfert H, Dichtel WJ, Medina JE, Lindberg RD, Luna MD. Perineural invasion in squamous cell skin carcinoma of the head and neck. *Am J Surg.* 1984;148:542-547.
 20. Brodland DG, Zitelli JA. Surgical margins for excision in primary cutaneous squamous cell carcinoma. *J Am Acad Dermatol.* 1992;27:241-248.
 21. Altman A, Rosen T, Tschen JA, Hoffmann T, Bruce S, Siegel DM, et al. Basal cell epithelioma in black patients. *J Am Acad Dermatol.* 1987;17:741-745.
 22. Miller DL, Weinstock MA. Nonmelanoma skin cancer in the United States: Incidence. *J Am Acad Dermatol.* 1994;0:774-778.
 23. Reigosa A, Pérez C, Perozo M, Caleiras E, Saldivia F, Fernández-Tortolero A. Expresión de vimentina y su relación con las clases moleculares y el pronóstico en cáncer de mama. *Gac Med Caracas.* 2017;125:207-217.
 24. Meijuan Z, Liang Z, Zhenhua D. miR-365 Promotes Cutaneous Squamous Cell Carcinoma (CSCC) through Targeting Nuclear Factor I/B (NFIB). *PLoS One* 2014;9:e100620.
 25. Reis-Filho JS, Torio B, Albergaria A, Schmitt FC. p63 expression in normal skin and usual cutaneous carcinomas. *J Cutan Pathol.* 2002;29:517-523.
 26. Barbosa F, Ferron C, Pérez Cardoso G. Surgical treatment of basal cell carcinoma: An algorithm based on the literature. *An Bras Dermatol.* 2015;90:377-783.
 27. King KE, Weinberg WC. p63: Defining Roles in Morphogenesis, Homeostasis, and Neoplasia of the Epidermis. *Mol Carcinog.* 2007;46:716-724.
 28. Dotto JE, Glusac EJ. p63 is a useful marker for cutaneous spindle cell squamous cell carcinoma. *J Cutan Pathol.* 2006;33:413-417.
 29. Romano RA, Smalley K, Magraw C, Serna VA, Kurita T, Raghavan S. Δ Np63 knockout mice reveal its indispensable role as a master regulator of epithelial development and differentiation. *Development.* 2012;139:772-782.
 30. Su X, Paris M, Gi YJ, Tsai KY, Cho MS, Lin YL. TAp63 prevents premature aging by promoting adult stem cell maintenance. *Cell Stem Cell.* 2009;5:64-75.
 31. Su X, Chakravarti D, Cho MS, Liu L, Gi YJ, Lin YL. TAp63 suppresses metastasis through coordinate regulation of Dicer and miRNAs. *Nature.* 2010;467:986-990.
 32. Vasilaki E, Morikawa M, Koinuma D, Mizutani A. Aug. Ras and TGF- β signaling enhance cancer progression by promoting the Δ Np63 transcriptional program. *Sci Signal.* 2016;23:442-484.
 33. Thompson A, Kelley B, Prokop L, Murad M, Baum C. Risk Factors for Cutaneous Squamous Cell Carcinoma Recurrence, Metastasis, and Disease-Specific Death: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Dermatol.* 2016;152:419-428.
 34. Schoelch S, Barrett T, Greenway H. Recognition and management of high-risk cutaneous tumors. *Dermatol Clin.* 1999;17:93-111.
 35. Rippey JJ. Why classify basal cell carcinomas? *Histopathology* 1998;32:393-398.
 36. Wolff AC, Hammond ME, Hicks DG, Dowsett M, McShane LM, Allison KH, et al. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/ College of American Pathologists clinical practice guideline update. *J Clin Oncol.* 2013;31:3997-4013.

37. Hammond ME, Hayes DF, Dowsett M, Allred DC, Hagerty KL, Badve S, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *Arch Pathol Lab Med* 2010; 134:907-922.
38. Hampel H, Bennett RL, Buchanan A, Pearlman R, Wiesner GL et al. A practice guideline from the American College of Medical Genetics and Genomics and the National Society of Genetic Counselors: Referral indications for cancer predisposition assessment 2015;17:70-87.
39. Pao W, Girard N. New driver mutations in non-small-cell lung cancer. *Lancet Oncol*. 2011;12:175-180.
40. Chung CH, Ely K, McGavran L, Varella-Garcia M, Parker J, Parker N, et al. Increased epidermal growth factor receptor gene copy number is associated with poor prognosis in head and neck squamous cell carcinomas. *J Clin Oncol*. 2006;24:4170-4176.
41. Reigosa A, Fernández A, Gutiérrez D, Caleiras E, Hardisson D, Espig H, et al. Expresión de p63 y citoqueratina 5/6 en los diferentes tipos moleculares del carcinoma de mama. *Rev Esp Patol*. 2010;43:79-85.
42. Lo Muzio L, Santarelli A, Caltabiano R, Rubini C, Pieramici T, Trevisiol L, et al. p63 overexpression associates with poor prognosis in head and neck squamous cell carcinoma. *Hum Pathol*. 2005;36:187-194.
43. Thurfjell N, Coates PJ, Boldrup L, Lindgren B, Bäcklund B, Uusitalo T, et al. Function and importance of p63 in normal oral mucosa and squamous cell carcinoma of the head and neck. *Adv Otorhinolaryngol*. 2005;62:49-57.
44. Plaza JA, Ortega PF, Stockman DL, Suster S. Value of p63 and podoplanin (D2-40) immunoreactivity in the distinction between primary cutaneous tumors and adenocarcinomas metastatic to the skin: A clinicopathologic and immunohistochemical study of 79 cases. *J Cutan Pathol*. 2010;37:403-410.
45. DeYoung MP, Johannessen CM, Leong CO, Faquin W, Rocco JW, Ellisen LW. Tumor-specific p73 up-regulation mediates p63 dependence in squamous cell carcinoma. *Cancer Res*. 2006;66:9362-9368.
46. Abbas O, Richards JE, Yaar R, Mahalingam M. Stem cell markers (cytokeratin 15, cytokeratin 19 and p63) in in situ and invasive cutaneous epithelial lesions. *Mod Pathol*. 2011;24:90-97.
47. Matin RN, Chikh A, Chong SL, Mesher D, Graf M, Sanza P, et al. p63 is an alternative p53 repressor in melanoma that confers chemoresistance and a poor prognosis. *J Exp Med*. 2013;210:581-603.
48. Ferone G, Mollo MR, Missero C. Epidermal cell junctions and their regulation by p63 in health and disease. *Cell Tissue Res*. 2015;360:513-528.
49. Inoue K, Fry EA. *Subcell Biochem*. 2014;85:17-40. Alterations of p63 and p73 in human cancers. *Subcell Biochem*. 2014;85:17-40.