MORIS ANGER

Expressão de proteínas da apoptose em melanoma cutâneo primário

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Clínica Cirúrgica
Orientador: Prof. Dr. Henri Friedhofer

São Paulo
2008

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

© reprodução autorizada pelo autor

Anger, Moris

Expressão de proteínas da apoptose em melanoma cutâneo primário / Moris Anger. -- São Paulo, 2008.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Departamento de Cirurgia.

Área de concentração: Clínica Cirúrgica.

Orientador: Henri Friedhofer.

Descritores: 1.Neoplasias cutâneas 2.Melanoma 3.Apoptose 4.Bcl2 5.Caspases 6.Proteína ligante Fas 7.BAX 8.BAK 9.Apaf-1

USP/FM/SBD-418/08

Este estudo é dedicado àquele que
é o ponto central da profissão médica,
o doente.

É dedicado especialmente aos que foram atingidos
pela patologia em estudo,
para quem este trabalho foi realizado,
com a intenção de nos aproximarmos cada vez mais
do objetivo de minorar seu sofrimento,
procurar melhores métodos de prevenção,
e aprimorar o tratamento desta doença, o melanoma.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Marcus Castro Ferreira e ao Prof. Dr. Henri Friedhofer, do Departamento de Cirurgia Plástica da FMUSP, pela oportunidade de realizar este projeto.

Ao Prof. Dr. José Eluf Neto, do Departamento de Medicina Preventiva da FMUSP, pelo apoio e incentivo.

Ao Departamento de Anatomia Patológica do Hospital A. C. Camargo, na pessoa do seu diretor, Prof. Dr. Fernando Antonio Soares, e também à equipe técnica em *Tissue Microarray* e Imuno-histoquímica.

Ao Prof. Dr. Gilles Landman e ao Prof. Dr. João Pedreira Duprat Neto, do Hospital A. C. Camargo, pois, sem seu apoio e contribuição, este estudo não teria sido possível.

Aos residentes do Serviço de Cirurgia Plástica do Hospital Brigadeiro que, ao longo dos anos, tornaram possível o acompanhamento dos pacientes que fazem parte deste estudo, nominalmente Doutores Raquel Die' Maia, Juana Maria Câmara Rios Portales, Mônica Lucia Rodrigues, Ricardo Varisco, Eduardo Arnaut dos Santos Lima, Fabiano Gustavo Herrero de Azevedo e Marina Fussae Fukutaki.

A Silvana Santos, Editora Científica, pela sua contribuição em texto e estatística.

Às queridas Silvia e Gabriela, que sofreram junto e ajudaram em tudo o que foi possível.

Este estudo foi realizado com apoio financeiro da FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, e realizado no Departamento de Anatomia Patológica do Hospital A. C. Camargo, sob a coordenação do Prof. Dr. Gilles Landman (Processo número 2007/08068-2).

Sumário

Lista de abreviaturas viii
Lista de tabelas ix
Lista de figuras xi
Resumo xv
Summary xvi
1. INTRODUÇÃO 1
2. OBJETIVOS 4
3. REVISÃO DA LITERATURA 5
3.1 Melanoma 5
3.2 Apoptose 9
3.3 Melanoma e apoptose 13
4. MÉTODOS 17
4.1 Casuística 17
4.2 Métodos 18
4.2.1 Leitura da expressão protéica 24
4.2.2 Método estatístico …..... 26
5. RESULTADOS 29
5.1 Resultados epidemiológicos 29
5.2 Expressão protéica os melanomas cutâneos primários 42
5.2.1 Bcl2 42
5.2.2 Bax 44
5.2.3 Bak 45
5.2.4 Apaf-1 47
5.2.5 Caspase3 (citoplasma) 48
5.2.6 Caspase9 (citoplasma) 50
5.2.7 Caspase8 (citoplasma) 51
5.2.8 FasL (membrana) 53
5.2.9 FasL (citoplasma) 54
5.2.10 Fas (membrana) 56
5.2.11 Fas (citoplasma) 57

5.3 Expressão protéica e evolução dos melanomas cutâneos primários 59
6. DISCUSSÃO 61
7. CONCLUSÕES 69
8. ANEXOS 70
9. REFERÊNCIAS 105

Lista de abreviaturas

Apaf-1	*Apoptotic peptidase-activating factor 1*
Bak	*Bcl2 homologous antagonist/killer*
Bax	*Bcl2-associated X protein*
Bcl-2	*B-cell lymphoma 2*
Fas	*Fatty acid synthetase*
	(TNF receptor superfamily, member 6)
FasL	*Fas ligand protein*
TMA	*Tissue Micro Array*

Lista de tabelas

Tabela 1	Achados clínicos e epidemiológicos em um grupo de 69 pacientes com melanoma cutâneo primário	29
Tabela 2	Médias e desvios-padrão relativos à idade dos pacientes distribuídos de acordo com o sexo em relação à localização das lesões	31
Tabela 3	Médias e desvios-padrão relativos à idade dos pacientes distribuídos de acordo com os índices de Breslow e os níveis de Clark	33
Tabela 4	Distribuição percentual dos pacientes de acordo com os índices de Breslow e níveis de Clark	35
Tabela 5	Dados descritivos relativos aos achados histológicos em 69 pacientes com melanoma cutâneo	36
Tabela 6	Distribuição percentual das freqüências relativas à evolução dos pacientes distribuídos de acordo com os índices de Breslow	39
Tabela 7	Distribuição percentual das freqüências relativas à evolução dos pacientes distribuídos de acordo com os níveis de Clark	39
Tabela 8	Índices de tempo livre da doença calculados por Análise Actuarial e pelo Produto de Kaplan-Meier	40
Tabela 9	Índices de sobrevida calculados por Análise Actuarial e pelo Produto de Kaplan-Meier	41
Tabela 10	Valores descritivos relativos às médias±desvios-padrão dos escores compostos de expressão da Bcl2 nos diferentes grupos de estudo	43
Tabela 11	Valores descritivos relativos às médias±desvios-padrão dos escores compostos de expressão da BAX nos diferentes grupos de estudo	45
Tabela 12	Valores descritivos relativos às médias±desvios-padrão dos escores compostos de expressão da BAK nos diferentes grupos de estudo	46

Tabela 13 Valores descritivos relativos às médias±desvios-padrão dos escores compostos de expressão da Apaf-1 nos diferentes grupos de estudo 48
Tabela 14 Valores descritivos relativos às médias±desvios-padrão dos escores compostos de expressão da Caspase3 (citoplasma) nos diferentes grupos de estudo 49
Tabela 15 Valores descritivos relativos às médias±desvios-padrão dos escores compostos de expressão da Caspase9 (citoplasma) nos diferentes grupos de estudo 51
Tabela 16 Valores descritivos relativos às médias±desvios-padrão dos escores compostos de expressão da Caspase8 (citoplasma) nos diferentes grupos de estudo 52
Tabela 17 Valores descritivos relativos às médias±desvios-padrão dos escores compostos de expressão da FasL (membrana) nos diferentes grupos de estudo 53
Tabela 18 Valores descritivos relativos às médias±desvios-padrão dos escores compostos de expressão da FasL (citoplasma) nos diferentes grupos de estudo 55
Tabela 19 Valores descritivos relativos às médias±desvios-padrão dos escores compostos de expressão da Fas (membrana) nos diferentes grupos de estudo 57
Tabela 20 Valores descritivos relativos às médias±desvios-padrão dos escores compostos de expressão da Fas (citoplasma) nos diferentes grupos de estudo 58
Tabela 21 Síntese dos resultados estatísticos relativos aos escores compostos médios da expressão das proteínas da apoptose dos melanomas em relação aos nevos-controle 59
Tabela 22 Comparação das médias±desvios-padrão dos escores compostos relativos à expressão das proteínas da apoptose conforme a evolução dos melanomas ≥ 1 mm 60
Tabela 23 Distribuição das freqüências relativas ao valor mediano do padrão não neoplásico positiva ou negativa das proteínas da apoptose conforme a evolução dos melanomas ≥ 1 mm 60

Lista de figuras

Figura 1	Vias da apoptose	11
Figura 2	Imagem de amostra de melanoma *in situ* corada com Hematoxilina e Eosina. Caso 32. (Aumento de 40x)	18
Figura 3	Imagem de amostra de melanoma com espessura de 2,4 mm corada com Hematoxilina e Eosina. Caso 54. (Aumento 40x, à esquerda, e 400x, à direita)	18
Figura 4	Imagem fotográfica do *Tissue Microarrayer*, aparelho utilizado para transferência do tecido do bloco doador para o bloco receptor	19
Figura 5	Retirada de material do bloco doador (à esquerda) e montagem do bloco receptor (à direita). (Técnica de *Tissue Microarray,* TMA)	29
Figura 6	Figura 6. Lâmina de controle positivo para Apaf-1. (Aumento de 400x)	23
Figura 7	Imagem fotográfica do equipamento ACIS III acoplado a computador	24
Figura 8	Imagem fotográfica do monitor de vídeo mostrando janela produzida pelo programa específico para o equipamento ACIS III	25
Figura 9	Curvas representativas das médias de idade em relação à localização do melanoma cutâneo primário	31
Figura 10	Distribuição das freqüências relativas aos índices de Breslow de acordo com a localização do melanoma cutâneo primário ...	34
Figura 11	Distribuição das freqüências relativas aos níveis de Clark de acordo com a localização do melanoma cutâneo primário	35
Figura 12	Imagem fotográfica dos aspectos pré (à esquerda) e pós-operatório (à direita) de melanoma primário cutâneo em região de cabeça e pescoço, com espessura de 4,2 mm. Caso 12. Disseminação da doença 125 meses após tratamento	37

Figura 13 Imagem fotográfica dos aspectos pré (à esquerda) e pós-operatório (à direita) de melanoma primário cutâneo em membro superior, com espessura de 7,0 mm. Caso 43. Disseminação da doença diagnosticada 43 meses após tratamento, seguida de óbito 37

Figura 14 Imagem fotográfica do aspecto pós-operatório de melanoma primário cutâneo com espessura de 5,0 mm em região de cabeça e pescoço (acima à esquerda). Caso 44. Disseminação da doença em região cervical (acima à direita), em mão (abaixo à esquerda) e em membro (abaixo à direita) seis meses após tratamento, seguida de óbito 38

Figura 15 Curva actuarial do tempo livre da doença (linha cinza) e do tempo de sobrevida (linha preta) após tratamento de melanomas $\geq$ 1 mm 41

Figura 16 Imagem fotográfica das lâminas de TMA para estudo da expressão de Bcl2 em nevo-controle (à esquerda) e em melanoma com espessura de 2,8 mm (à direita). Caso 68. (Aumento de 400x) 42

Figura 17 Representação gráfica da distribuição das freqüências relativas ao valor mediano do padrão não neoplásico da Bcl2 de acordo com a espessura dos melanomas (< ou $\geq$ 1mm). χ^2 = 17,88; 1 grau de liberdade; p = 0,000 43

Figura 18 Imagem fotográfica das lâminas de TMA para estudo da expressão de BAX em nevo-controle (à esquerda) e em melanoma com espessura de 4,2 mm (à direita). Caso 12. (Aumento de 400x) 44

Figura 19 Representação gráfica da distribuição das freqüências relativas ao valor mediano do padrão não neoplásico da BAX de acordo com a espessura dos melanomas (< ou $\geq$ 1mm). χ^2 = 6,74; 1 grau de liberdade; p = 0,009 45

Figura 20 Imagem fotográfica das lâminas de TMA para estudo da expressão de BAK em nevo-controle (à esquerda) e em melanoma com espessura de 2,8 mm (à direita). Caso 68. (Aumento de 400x) 46

Figura 21 Representação gráfica da distribuição das freqüências relativas ao valor mediano do padrão não neoplásico da BAK de acordo com a espessura dos melanomas (< ou ≥ 1mm). χ^2 = 0,014; 1 grau de liberdade; p = 0,905 46

Figura 22 Imagem fotográfica das lâminas de TMA para estudo da expressão de Apaf-1 em nevo-controle (à esquerda) e em melanoma com espessura de 2,8 mm (à direita). Caso 68. (Aumento de 400x) 47

Figura 23 Representação gráfica da distribuição das freqüências relativas ao valor mediano do padrão não neoplásico da Apaf-1 de acordo com a espessura dos melanomas (< ou ≥ 1mm). χ^2 = 0,019; 1 grau de liberdade; p = 0,890 48

Figura 24 Imagem fotográfica das lâminas de TMA para estudo da expressão de Caspase3 em nevo-controle (à esquerda) e em melanoma com espessura de 4,2 mm (à direita). Caso 12. (Aumento de 400x) 49

Figura 25 Representação gráfica da distribuição das freqüências relativas ao valor mediano do padrão não neoplásico da Caspase3 (citoplasma) de acordo com a espessura dos melanomas (< ou ≥ 1mm). χ^2 = 28,57; 1 grau de liberdade; p = 0,000 49

Figura 26 Imagem fotográfica das lâminas de TMA para estudo da expressão de Caspase9 em nevo-controle (à esquerda) e em melanoma com espessura de 2,8 mm (à direita). Caso 68. (Aumento de 400x) 50

Figura 27 Representação gráfica da distribuição das freqüências relativas ao valor mediano do padrão não neoplásico da Caspase9 (citoplasma) de acordo com a espessura dos melanomas (< ou ≥ 1mm). χ^2 = 0,01; 1 grau de liberdade; p = 0,950 51

Figura 28 Imagem fotográfica das lâminas de TMA para estudo da expressão de Caspase8 em nevo-controle (à esquerda) e em melanoma com espessura de 2,8 mm (à direita). Caso 68. (Aumento de 400x) 52

Figura 29 Representação gráfica da distribuição das freqüências relativas ao valor mediano do padrão não neoplásico da Caspase8 (citoplasma) de acordo com a espessura dos melanomas (< ou ≥ 1mm). χ^2 = 0,23; 1 grau de liberdade; p = 0,631 52

Figura 30 Representação gráfica da distribuição das freqüências relativas ao valor mediano do padrão não neoplásico da FasL (membrana) de acordo com a espessura dos melanomas (< ou ≥ 1mm). χ^2 = 0,42; 1 grau de liberdade; p = 0,516 54

Figura 31 Imagem fotográfica das lâminas de TMA para estudo da expressão de FasL em nevo-controle (à esquerda) e em melanoma com espessura de 2,8 mm (à direita). Caso 68. (Aumento de 400x) 54

Figura 32 Representação gráfica da distribuição das freqüências relativas ao valor mediano do padrão não neoplásico da FasL (citoplasma) de acordo com a espessura dos melanomas (< ou ≥ 1mm). χ^2 = 1,58; 1 grau de liberdade; p = 0,208 55

Figura 33 Imagem fotográfica das lâminas de TMA para estudo da expressão de Fas em nevo-controle (à esquerda) e em melanoma com espessura de 2,8 mm (à direita). Caso 68. (Aumento de 400x) 56

Figura 34 Representação gráfica da distribuição das freqüências relativas ao valor mediano do padrão não neoplásico da Fas (membrana) de acordo com a espessura dos melanomas (< ou ≥ 1mm). χ^2 = 3,64; 1 grau de liberdade; p = 0,050 57

Figura 35 Representação gráfica da distribuição das freqüências relativas ao valor mediano do padrão não neoplásico da Fas (membrana) de acordo com a espessura dos melanomas (≤ ou ≥ 1mm). χ^2 = 2,34; 1 grau de liberdade; p = 0,126 58

Resumo

Anger M. *Expressão de proteínas da apoptose em melanoma cutâneo* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2008.

Melanoma cutâneo ainda constitui a principal causa de morte por câncer de pele nos países desenvolvidos. A variabilidade do comportamento clínico dessa neoplasia tem sido apenas parcialmente explicada pelos aspectos clínicos e histológicos, e a identificação de variáveis biológicas pode vir a ser importante na determinação de grupos de risco específicos. Foram estudados 69 pacientes com melanoma cutâneo primário de diversos graus de gravidade, tratados entre 1990 e 2007, com o intuito de verificar aspectos clínicos e epidemiológicos, preparar *Tissue microarray* (TMA) para estudo dos melanomas cutâneos primários com espessura maior que 1,0 mm, avaliar por análise imuno-histoquímica a expressão das proteínas da apoptose celular Bcl2, Bax, Bak, Apaf-1, Caspase 3, Caspase 9, Caspase 8, FasL e Fas em nevos-controle e em melanomas primários com espessuras menores e maiores que 1mm, e correlacionar a expressão dessas proteínas da apoptose com a evolução de melanomas cutâneos primários. Os resultados ratificaram tanto dados epidemiológicos já publicados em relação a sexo, idade e local da lesão, quanto a correlação entre a evolução da doença e os índices de Breslow. A análise dos escores compostos relativos à expressão das proteínas da apoptose revelou que o perfil imuno-histoquímico dessas proteínas parece não ter significado prognóstico, uma vez que não houve diferenças de expressão entre pacientes com e sem doença disseminada. Não foram encontradas alterações na expressão das proteínas da apoptose estudadas que pudessem sugerir o seu envolvimento tanto na gênese quanto na progressão de melanoma primário. O perfil imuno-histoquímico com tendência pró-apoptótica parece indicar que outros fatores seriam responsáveis pelo crescimento e disseminação da neoplasia.

Descritores: 1.Neoplasias cutâneas 2.Melanoma 3.Apoptose 4.Bcl2 5.Caspases 6.Proteína ligante Fas 7.BAX 8.BAK 9.Apaf-1.

Summary

Anger M. *Apoptosis proteins expression in cutaneous melanoma.* [thesis]. São Paulo: Medicine School, University of São Paulo; 2008.

Cutaneous melanoma still constitutes the main cause of skin cancer death in developed world. Clinical behavior variability of this neoplasia has been only partially explained by clinical and histological aspects, and identification of biological variables can be important for determining specific risk groups. Sixty nine (69) patients with mild to severe primary cutaneous melanoma treated in 1990-2007 were studied aiming at (a) verifying clinical epidemiological aspects, (b) generating a *Tissue microarray* (TMA) for characterizing proteins expression of cutaneous melanoma $\geq$ 1.0 mm, (c) analyzing the immunohistochemical expression of the apoptosis proteins Bcl2, Bax, Bak, Apaf-1, Caspase 3, Caspase 9, Caspase 8, FasL e Fas in 10 control nevi and in primary melanomas with thickness < 1mm and $\geq$ 1mm, (d) and correlating these proteins expression with the disease prognosis. Results have ratified known epidemiological date on gender, age and lesion localization as well as the correlation between the disease prognosis and the Breslow's indexes. Analysis of the composite scores relating to apoptosis proteins has revealed that their immunohistochemical profile seems to be not significant for determining the disease prognosis, since no differences in proteins expression were found when compared patients with and without disease dissemination. Alterations in proteins expression suggesting their role in the genesis as well as in the prognosis of primary melanoma were not evidenced. Immunohistochemical profile with pro-apoptosis trend seems to indicate other factor as responsible for the neoplasia growth and dissemination.

Keywords: 1.Skin neoplasias. 2.Melanoma 3.Apoptosis. 4.Bcl2 5.Caspases 6.Fas ligant protein 7.BAX 8.BAK 9.Apaf-1.

1. Introdução

Os melanomas podem se desenvolver em qualquer tecido em que existam melanócitos que, por sua vez, são células pigmentadas encontradas em quase todos os organismos vivos. Nos seres humanos, esses melanócitos se originam das células neuroendócrinas, e são encontrados em diversas localizações do corpo humano como a pele, os olhos, a membrana epitelial da orelha interna e as leptomeninges. O melanoma cutâneo é a forma prevalente da doença[10].

Em populações caucasianas, trata-se do segundo tipo de câncer com disseminação mais rápida e, embora se trate de neoplasia com bom prognóstico quando diagnosticada precocemente, está associada com uma das mais altas taxas de mortalidade nos casos de doença mais avançada[38], atingindo taxas de sobrevida em cinco anos tão baixas quanto 41% em casos de metástases regionais em nódulos linfáticos[70].

Nos últimos anos, a incidência do melanoma cutâneo primário vem apresentando aumento estável e preocupante decorrente, principalmente, de exposição mais constante da pele ao sol, o que acarreta dano genético decorrente de radiação ultravioleta[22], que vem sendo considerada o principal fator etiológico de câncer de pele[10].

Variáveis clínicas e histológicas, como os índices de Breslow, o tamanho e a localização da lesão inicial, e a presença de ulceração e/ou de invasão vascular vêm sendo consideradas os únicos instrumentos mais adequa-

dos para a avaliação prognóstica dos casos de melanoma; todavia, como se trata de doença com comportamento clínico muito peculiar a cada paciente, nem sempre essas variáveis são suficientes para predizer com acurácia o prognóstico específico a cada caso[1]. Por isso, a despeito de os aspectos clínicos e epidemiológicos já estarem aparentemente bem determinados, ainda são importante contribuições clínicas e epidemiológicas que enriqueçam ainda mais esse conhecimento, e é este o motivo do primeiro objetivo deste trabalho: Estudar os aspectos demográficos, clínicos e morfológicos em melanomas cutâneos primários.

Por outro lado, os avanços nas pesquisas genômicas realizados na última década vêm colaborando, igualmente, para o entendimento mais amplo do melanoma. Observações moleculares certamente virão a influenciar efetivamente no diagnóstico, na classificação, no prognóstico e no tratamento do melanoma[64].

Neste sentido, além de outras aberrações moleculares, defeitos na regulação da apoptose vêm sendo associados com a progressão do melanoma, sua disseminação e mesmo sua resistência aos regimes quimioterápicos[22].

Há consenso entre os pesquisadores que existem duas vias principais para apoptose: a intrínseca e a extrínseca, nas quais participa uma série de proteínas pró-apoptóticas e anti-apoptóticas cuja função é regular os mecnismos de regulação da morte celular programada[10].

Dentre essas proteínas, já foram principalmente associadas à gênese e/ou à progressão do melanoma cutâneo APAF-1[5,15,55,67]; Bax e Bak[26,45]; e

Fas e FasL[60,65]. A maior parte dos estudos referem-se, porém, à expressão de Bcl-2[10,44,59,63,70,71,79], provavelmente por ter sido a uma das primeiras proteínas identificadas no mecanismo da apoptose[10].

Os resultados de estudos que tentam relacionar a expressão dessas proteínas ao melanoma, contudo, ainda são controversos. Além disso, esses estudos empregam diferentes técnicas para leitura da expressão dessas proteínas, bem como utilizam diferentes metodologias para elaborar critérios que determinem tanto padrões de positividade e negatividade quanto padrões normais de expressão dessas proteínas.

Mais recentemente, o uso de *Tissue microarrays* (TMA) tem se mostrado técnica útil para o estudo de melanomas malignos[1,15,22,35,41]. Em nosso meio, a técnica de TMA também foi utilizada em blocos de melanoma para pesquisas das proteínas do ciclo celular[46,61,62]. Neste sentido, com os resultados relatados com o uso dessa técnica, propusemo-nos a desenvolver TMA para estudo dos melanomas primários com espessura maior que 1,0 mm, o que constituiu o segundo objetivo desta investigação.

Por fim, considerando que o eventual encontro de falhas no controle da apoptose poderia vir a elucidar a vantagem proliferativa nas células neoplásicas, esta pesquisa se voltou principalmente para a avaliação imunohistoquímica da expressão das proteínas da apoptose celular APAF-1, Bcl-2, Bak, Bax, Caspase 9, Caspase 3, Fas, Fas-L e Caspase 8 em nevos-controle e em melanomas cutâneos primários, e correlacionar esses achados com a evolução da doença.

2. Objetivos

Este estudo foi realizado com os seguintes objetivos:

- Estudar os aspectos clínicos e epidemiológicos em melanomas cutâneos primários.

- Avaliar por análise imuno-histoquímica a expressão das proteínas da apoptose celular Bcl2, Bax, Bak, Apaf-1, Caspase 3, Caspase 9, Caspase 8, FasL e Fas em nevos-controle e em melanomas primários com espessuras menores e maiores que 1mm.

- Correlacionar a expressão das proteínas da apoptose celular com a evolução de melanomas cutâneos primários.

3. Revisão de literatura

3.1 Melanoma

Embora já constasse das escrituras de Hipócrates (460 a 375 a.C.) descrição pertinente ao melanoma, esse termo só veio a ser cunhado em 1838, quando Robert Carswell o utilizou para descrever lesões malignas pigmentadas da pele[76].

Sabe-se, hoje, que o melanoma é um tumor de origem neuroectodérmica, que resulta da transformação dos melanócitos epidérmicos que migram da crista neural para toda a epiderme durante a embriogênese. Os melanócitos, por sua vez, são células encontradas ao longo da camada basal da epiderme, cuja principal função é a produção do pigmento melanina, conferindo tom castanho à pele, e é importante pela fotoproteção natural. Normalmente estão quiescentes, podendo apresentar discreta atividade mitótica, em função de estímulos agressivos, como ocorre na cicatrização ou na radiação ultravioleta[13].

Uma vez que mecanismos de invasão e disseminação são características inatas dos melanócitos, o melanoma cutâneo apresenta grande potencial para metastatização, mesmo em fases iniciais de sua manifestação, razão pela qual constitui uma das neoplasias mais graves dentre as lesões de pele, com alto índice de mortalidade quando diagnosticado tardiamente[7].

A incidência de melanoma primário é historicamente baixa, mas vem

aumentando gradualmente nas últimas quatro décadas, principalmente em populações de pele clara, que parecem apresentar maior suscetibilidade para esse tipo de tumor, hipótese que se fortalece no fato de a sua ocorrência ser significativamente inferior em populações de raça negra e amarela[72,77]. De modo geral, afeta homens e mulheres brancos em proporções semelhantes, embora estudos epidemiológicos realizados em diferentes países indiquem maior prevalência ora no sexo masculino ora no feminino[36]. No Brasil, parece haver predomínio de mulheres com idade superior a 40 anos afetadas pela doença[14]. Essa diferença parece estar relacionada à cultura de cada país no que se refere a quem expõe qual parte do corpo ao sol com maior freqüência[58].

De fato, dependendo do local da lesão, homens e mulheres são acometidos em freqüências diferentes. Lesões em tronco são mais freqüentes entre homens, enquanto as lesões em membros inferiores prevalecem entre as mulheres[11,14,27]. Já as lesões na região de cabeça e pescoço e em membros superiores ocorrem em freqüências semelhantes em ambos os sexos[14].

No sul do Brasil, o aumento relativo da incidência de melanoma entre 1979 e 1987 foi de 38% entre os homens e de 11% entre as mulheres[2]. Esse aumento, ainda que em proporções menores, foi ratificado posteriormente em levantamento realizado em São Paulo, abrangendo o período entre 1963 e 1997[14].

Esses dados brasileiros não são diferentes de resultados de estudos epidemiológicos realizados em países desenvolvidos[9,19,40,48-52,56], que demonstraram que a freqüência de novos casos aumenta desde cerca de 3%-

7% ao ano, e chega a dobrar a cada período de 10-15 anos, conforme a população estudada[11].

O maior aumento na ocorrência dessa neoplasia refere-se geralmente a lesões de menor espessura ou *in situ*[48,51], embora haja relatos de aumento no número de pacientes do sexo masculino com lesões mais espessas[19,40] que se contrapõem, por sua vez, à observação de outros autores de que nos últimos anos houve progressiva diminuição na incidência dessas lesões mais profundas, resultando em melhora dos indicadores prognósticos[48].

Essa menor ocorrência de lesões mais profundas parece decorrer de diagnóstico mais precoce associado com campanhas de prevenção contra o câncer de pele, as quais enfatizam a importância dos fatores de proteção à radiação solar[39].

Atualmente, o melanoma diagnosticado em fase precoce da doença é potencialmente curável, embora apresente letalidade ainda bastante alta nos casos de diagnóstico tardio[2]. Ressalte-se que, geralmente, este tumor apresenta duas fases distintas. Na fase inicial, a lesão apresenta crescimento radial, é plana e pequena, e possui comportamento menos agressivo. Na fase seguinte, o crescimento da lesão passa a ser vertical; as células malignas se localizam mais profundamente na derme reticular podendo, inclusive, invadir o subcutâneo, e apresentam pior prognóstico[76]. Sua agressividade é proporcional à sua capacidade de infiltrar a derme na transição de crescimento radial para crescimento vertical.

O tratamento dessa condição, inicialmente proposto 150 anos atrás, tem sido um desafio ao longo dos anos, especialmente no que concerne a

evitar a recorrência do tumor primário, e a sua evolução está diretamente relacionada com os avanços nos conhecimentos sobre a biologia e a história natural da doença. Em 1857, William Norris descreveu a ressecção ampla para o tratamento do tumor primário[23]; um ano mais tarde, Pamberton advogava a ressecção ampla e profunda[76]; em 1892, Herbert Snow descreveu a excisão da cadeia linfonodal simultânea à ressecção do tumor primário; e em 1907 Handley passou a recomendar a ressecção em blocos com margens amplas[23].

Até 40 anos atrás, o tratamento cirúrgico recomendado era a ressecção ampla do tumor com margens de segurança de até 5 cm além da borda tumoral, incluindo a fascia muscular subjacente quando possível; no entanto, o índice de sobrevida de cinco anos ainda era baixo, levando à procura de novos métodos de tratamento. Por essa razão, diversos estudos realizados nas décadas de 1950 e 1960 procuraram estabelecer os fatores prognósticos relacionados ao melanoma.

Em 1969, Clark et al.[12] propuseram critério de estadiamento das lesões fundamentado nos níveis de invasão da pele, e, a partir de então, a classificação do melanoma e a indicação de agressividade tumoral foram estabelecidas em função desses critérios. Posteriormente, Breslow e Macht[8] evidenciaram a importância da espessura em milímetros do melanoma primário, e esse índice passou a ser o indicador prognóstico mais importante[21,48] em associação com dados sobre ulceração, mitose e regressão[1,3].

Deste modo, taxas mais altas de sobrevida têm sido relatadas devido a diagnóstico clínico mais preciso associado com uso de dermatoscopia, exci-

são da lesão suspeita com margem mínima de 1 mm a 2 mm, seguida de cirurgia adequada aos resultados do exame anátomo-patológico. Além disso, o estudo do linfonodo sentinela e da margem de segurança oferece dados que podem ser muito importantes na avaliação prognóstica desses pacientes[42].

No entanto, pacientes com fatores prognósticos clínicos e anátomo-patológicos semelhantes podem evoluir de forma diversa, ora favoravelmente, ora com disseminação da doença, o que provavelmente seja devido a propriedades intrínsecas dessas células cancerosas. Daí diversos estudos estarem sendo conduzidos na busca de informações mais diretivas especialmente voltadas para as alterações genéticas envolvidas na tumorigênese e na progressão do melanoma[6,4,64,78].

É bem conhecido o ganho de sobrevida em células cujo mecanismo de apoptose foi bloqueado por mutações ou desvios metabólicos, e há descrições da influência de algumas proteínas de sua cascata no comportamento biológico dos melanomas[13,26,45,47,70,79].

O controle do ciclo celular requer delicado equilíbrio que, sendo alterado, pode acarretar divisão celular não controlada, e assim dar início a uma transformação maligna, resultado da interação de fatores genéticos, constitucionais e ambientais.

3.2 Apoptose

A morte celular pode ocorrer por processo acidental de agressão com

degeneração, necrose tecidual, presença de edema, ruptura da membrana e inflamação, ou por processo intracelular com fragmentação de suas estruturas e alteração da membrana plasmática seguida da remoção organizada por fagocitose, sem alterar as células saudáveis da sua vizinhança. Morte celular programada representa um mecanismo de degeneração normal de tecidos vivos de um organismo, numa seqüência de eventos baseados no metabolismo celular que levam à destruição da célula. Pode ocorrer tanto no desenvolvimento normal dos tecidos como em doenças[28,31].

Apoptose é a forma de destruição da célula estimulada por ações intracelulares ou por intermediação de receptores. Diferentemente da morte celular decorrente de traumas ou agressões à célula, este é um mecanismo fisiológico que visa à eliminação de células, e alguns autores o classificam separadamente da morte celular programada, por se originar em estímulos físicos ou químicos e não representar degeneração normal da vida de um organismo[31].

O interior da célula possui mecanismo sofisticado que a leva à morte, e a mitocôndria é estrutura importante na intermediação da apoptose. No seu interior e no espaço entre as membranas mitocondriais interna e externa, existem proteínas com a capacidade de ativar a apoptose, entre as quais uma das mais estudadas é o citocromo c, que, quando liberadas no citoplasma, levam a alterações cujo resultado final é a morte celular[17,33].

A apoptose é controlada por fatores extra e intracelulares, e tem início em resposta a estímulos variados que podem ocorrer por duas vias: a extrínseca e a intrínseca (Figura 1).

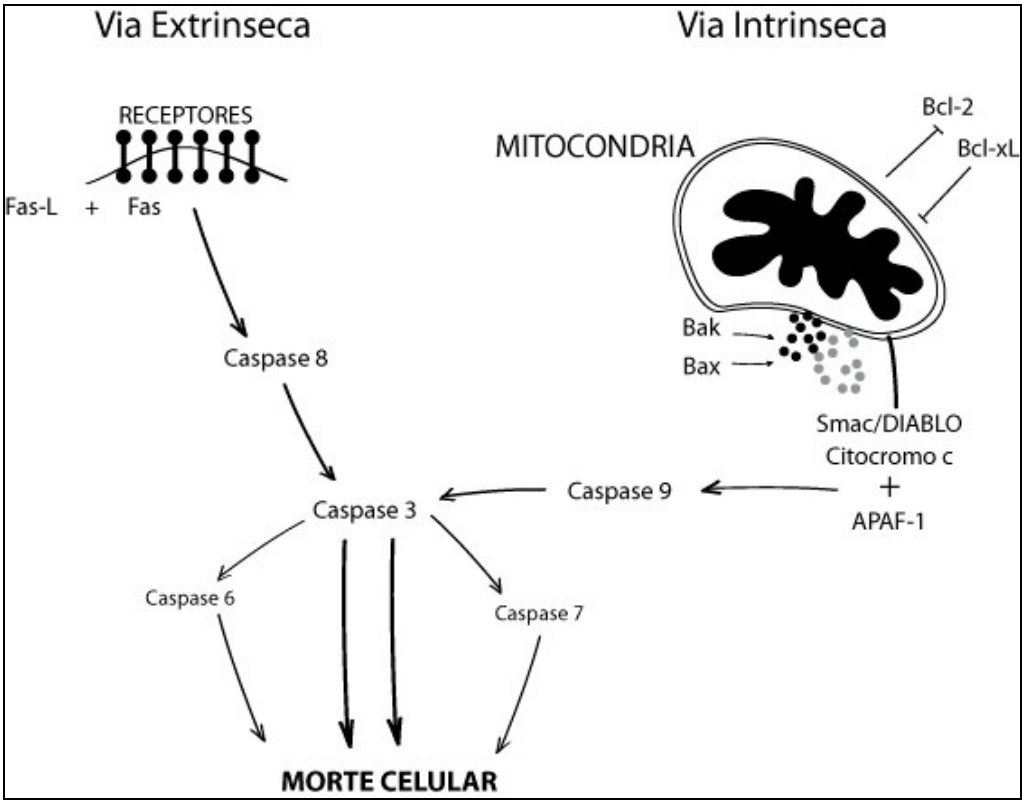

Figura 1. Vias da apoptose.

A via extrínseca se inicia com a ligação de receptores específicos para a morte celular na membrana plasmática, como o Fas (inibidor da apoptose), às proteínas apoptóticas, como o Fas-L (Fas ligante)[26,65], formando complexos (Apo-1/Fas) que atraem moléculas da proCaspase-8. Essa Caspase-8 ativa, posteriormente, o efetor Caspase-3 e induz a apoptose[31,32]. Assim, a Caspase-8 é considerada específica na via extrínseca da apoptose[18].

A via intrínseca atua na homeostasia intracelular, e algumas dessas proteínas da apoptose atuam no nível das membranas interna e externa da mitocôndria, aumentando a permeabilidade da membrana externa e possibilitando a saída para o lisossoma de substâncias que atuam na morte celular;

a esse processo dá-se o nome de Permeabilização da Membrana Mitocontrial Externa, ou MOMP[33,47].

Os executores centrais são as proteínas denominadas Caspases, várias das quais têm a função de iniciar o processo (Caspases 1, 2, 4, 5, 8, 9, 10), ativando enzimas desse ciclo. Outras Caspases (3, 6, 7) têm função efetora no processo, degradando estruturas celulares. O citocromo c estimula a formação da APAF-1 (*apoptosis-activating factor-1*) que, em conjunto com a protoCaspase 9, ativa a Caspase 9 que, por sua vez, interfere na clivagem de efetores como as Caspases 3, 6 e 7. Esse é um ponto sem retorno no processo de apoptose[28,32,75].

Há descrições de vias de apoptose que independem das Caspases e que são reguladas pelas proteínas da família Bcl[31], que consiste em um grupo grande de proteínas que atuam na mitocôndria, algumas com função pró-apoptótica, e outras com ação anti-apoptótica. As proteínas Bax (localizada no citoplasma) e Bak (localizada na membrana mitocondrial) têm função pró-apoptótica, observando-se em sua deleção uma resistência celular a um largo espectro de estímulos apoptóticos. Já a proteína Bcl-2 e outras, como a Bcl-xL, têm função anti-apoptótica, bloqueando a liberação do citocromo c da mitocôndria[29,33,68,70].

Já está bem estabelecido que falhas no processo de apoptose pode ter grande impacto no desenvolvimento de tumores malignos, que resulta do desequilíbrio entre proliferação e perda celular[55]. Há um grande número de publicações que enfatiza fatores envolvidos nesse impacto tanto sobre o desenvolvimento de diferentes neoplasias, incluindo o melanoma cutâneo,

quanto sobre diferentes fases da evolução tumoral[34].

3.3 Melanoma e apoptose

Uma série de estudos sobre a expressão das proteínas da apoptose vem sendo desenvolvida nos últimos anos para a identificação tanto de marcadores prognósticos quanto de terapias voltadas para o controle de melanoma em estágio avançado[20,25,26,33,37,47,57,66,70,79].

A forte resistência dos melanomas aos regimes quimioterápicos convencionais impulsionou a realização de estudos que a associaram com diferentes falhas nas cascatas que levam à apoptose[66]. Posteriormente, ficou demonstrado que alavancar a expressão de proteínas pró-apoptóticas resultou em menor resistência de células de melanomas à apoptose[20,25,37,57].

Pelo mesmo motivo (resistência aos agentes quimioterápicos), os melanomas foram incluídos em estudo que visou investigar se APAF-1 seria um supressor tumoral. Foi de fato observada baixa expressão e inativação de APAF-1 em melanomas primários e metastáticos, respectivamente, sugerindo-se que a perda de APAF-1 constituiria evento relativamente comum em melanomas e poderia ser indicador prognóstico da doença[67].

Resultados de estudo conduzido por Niedojadio et al.[55] indicaram a possibilidade de a expressão de Apaf-1 poder vir a constituir um marcador prognóstico para melanoma cutâneo humano, ao mesmo tempo em que a ausência de expressão dessa proteína seria importante fator predisponente dessa doença. Esse estudo veio ratificar os achados de Dai et al.[15], que ob-

servaram expressão de Apaf-1 significativamente reduzida em melanomas primários.

Baldi et al.[5], por sua vez, demonstraram expressão imuno-histoquímica significativamente diferente em nevos e melanomas, além de terem relatado correlação negativa significativa nos níveis de expressão de Apaf-1 tanto na comparação entre diferentes espessuras da lesão, quanto na comparação de lesões primárias e metastáticas. Esses achados levaram os autores a concluir que a perda na expressão de Apaf-1 pode ser preditiva de transformação maligna nos casos de melanoma cutâneo.

Melanomas com evolução desfavorável também já foram consistentemente associados com inativação de Bax e Bak[26], levando alguns estudiosos a entender que tanto os melanomas quanto o seu prognóstico poderão ser mais bem definidos com base no seu perfil de inativação de diferentes vias de apoptose, e que esses padrões moleculares poderão refletir perfis oncogênicos igualmente diferentes[45].

Expressão de Fas e FasL foi observada em células de melanomas e em linfócitos intratumorais, mas não foi evidenciada em melanócitos nem em células de nevos em tecido de pele sadia. Também foi demonstrado que a apoptose induzida por Fas em células de melanomas pode influenciar o prognóstico da doença, possivelmente pelo maior acúmulo de células anômalas que adquirem atividade metastática[65]. Por outro lado, Redondo et al.[60] sugeriram que a ausência de Fas em amostras de melanomas *in situ* e em melanomas espessos que não disseminaram pode constituir fato de bom prognóstico, enquanto o aumento da expressão de FasL observado em me-

lanomas metastáticos estaria associado com mau prognóstico.

Expressão alterada das proteínas Bcl-xL e Bcl-2 parece também estar envolvida tanto na gênese quanto na progressão do melanoma, pois há relatos de que a expressão aumentada dos genes Bcl-xL e Bcl-2 levam a potencial aumentado de malignidade e maior possibilidade de metastatização do melanoma[10,44,63,70,71].

A expressão dessas proteínas foi investigada em amostras de tecido tumoral de melanomas primários e metastáticos dos mesmos pacientes. Pares de amostras também foram expostas a UVB e depois avaliadas. Houve aumento da expressão de Bcl-xL e Bcl-2 nas amostras dos tumores metastáticos em relação aos tumores primários. Apoptose induzida por UVB foi associada apenas com redução na expressão de Bcl-xL[79]. Ressalte-se que a apoptose induzida por UVB independe de fototipo e da espessura do tumor, sugerindo-se que seja utilizada como teste laboratorial para o estudo de interações genético-ambientais envolvidas no melanoma[59].

Fayolle et al.[24] demonstraram que a inibição de superexpressão de Gadd45a induzida por UVB, por interferência de RNA, resultou em aumento dramático de morte celular, com ativação de Caspase3 e expressão reduzida de Bcl-xL.

Há pesquisas imuno-histoquímicas que evidenciaram decréscimo na expressão de Bcl-2 em melanomas cutâneos, sugerindo que essa subexpressão estaria relacionada ao crescimento autônomo característico do melanoma maligno[73]. Utikal et al.[74] demonstraram que a expressão concomitante de Bcl2 e cMyc parece estar associada com melanomas metastáti-

cos, mas não com melanomas primários. Schön et al.[63] relataram expressão aumentada de Bcl2 em células de melanomas metastáticos compradas a melanócitos de pele sadia. Recentemente, Espíndola e Corleta[22] não encontraram qualquer correlação entre expressão imuno-histoquímica de Bcl2 e progressão do melanoma cutâneo metastático.

4. Métodos

A realização deste estudo retrospectivo foi devidamente aprovada pelos Comitês de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, do Hospital A. C. Camargo, e do Hospital Brigadeiro (Anexo 1).

4.1 Casuística

Estudaram-se 69 casos de melanoma cutâneo primário, submetidos a tratamento cirúrgico entre 1990 e 2007 tanto em clínica privada (40 casos) quanto em unidade do Sistema Único de Saúde (Hospital Brigadeiro) (29 casos).

Foram adotados os seguintes critérios para inclusão dos pacientes no estudo:

(1) presença de apenas um melanoma primário;

(2) ausência de patologia prévia predisponente como, por exemplo, xeroderma pigmentoso;

(3) material suficiente e adequado nos blocos de parafina ou após a realização do estudo imuno-histoquímico.

4.2 Métodos

Os dados clínicos e epidemiológicos (Anexo 2), histológicos (Anexo 3) e os relativos à evolução da doença (Anexo 4) foram extraídos dos prontuários dos pacientes incluídos no estudo.

A revisão dos dados anátomo-patológicos foi obtida das lâminas armazenadas em diversos laboratórios, e, quando necessário, novas lâminas foram obtidas dos blocos de parafina e coradas com Hematoxilina e Eosina (HE), sendo elaborado novo laudo de acordo com o protocolo estabelecido pelo Grupo Brasileiro de Melanoma[43] (Figuras 2 e 3).

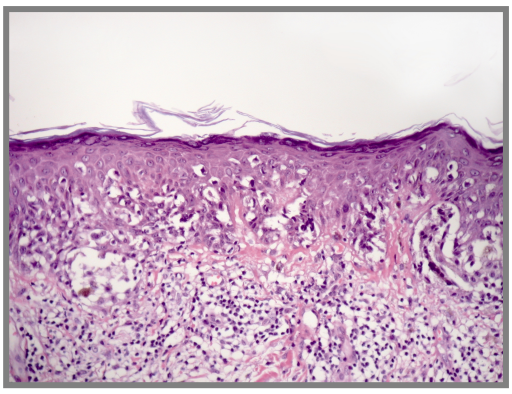

Figura 2. Imagem de amostra de melanoma *in situ* corada com Hematoxilina e Eosina. Caso 32. (Aumento de 40x).

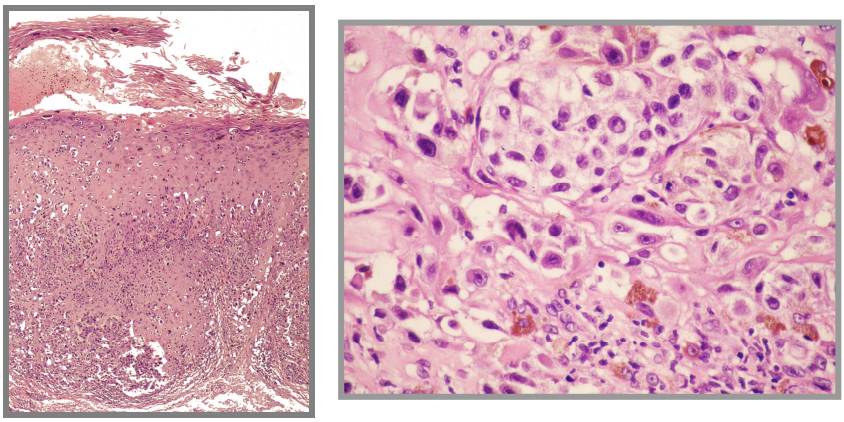

Figura 3. Imagem de amostra de melanoma com espessura de 2,4 mm corada da com Hematoxilina e Eosina Caso 54. (Aumento 40x, à esquerda, e 400x, à direita).

O estudo imuno-histoquímico foi realizado em cortes convencionais para melanomas menores que 1 mm de espessura, enquanto melanomas iguais ou maiores que 1 mm foram estudados em cortes histológicos obtidos por técnica de *Tissue Microarray* (TMA) a partir dos blocos de parafina do tumor primário.

Essa técnica permite a avaliação de dezenas de amostras teciduais fixadas em formalina em bloco de parafina, em uma única lâmina. Grande número de amostras pode ser estudado, mesmo se coletadas há vários anos, o que permite relacionar a análise dos dados com a evolução clínica dos pacientes. O cilindro de tecido retirado do bloco doador é transferido para o bloco receptor por aparelho chamado *tissue microarrayer* (*Beecher Instruments*, Silver Spring, MD, USA) (Figura 4).

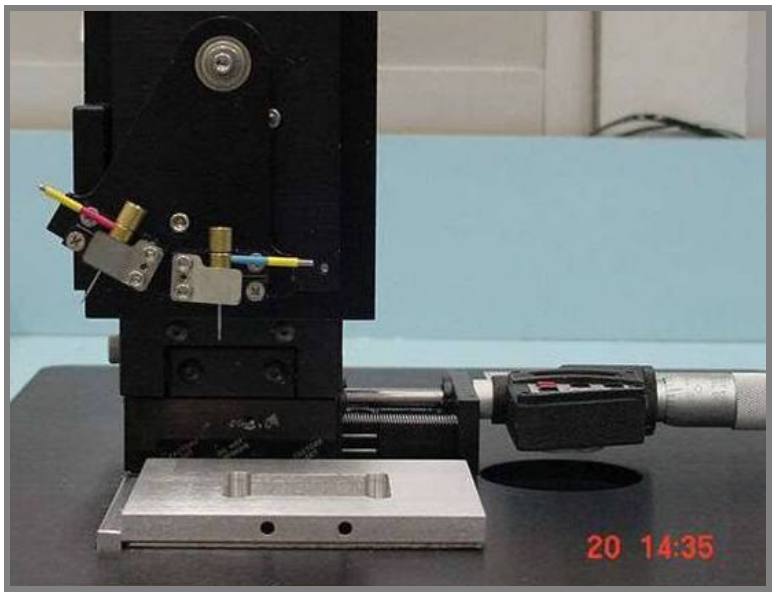

Figura 4. Imagem fotográfica do *Tissue Microarrayer*, aparelho utilizado para transferência do tecido do bloco doador para o bloco receptor.

A partir do corte original corado em HE, as áreas de tumor são marcadas com caneta, servindo de guia para identificação da área equivalente a ser puncionada no bloco de origem. De forma sucinta, consiste na obtenção por punção de áreas de interesse dos blocos de parafina, as quais são transferidas para um bloco receptor (Figura 5).

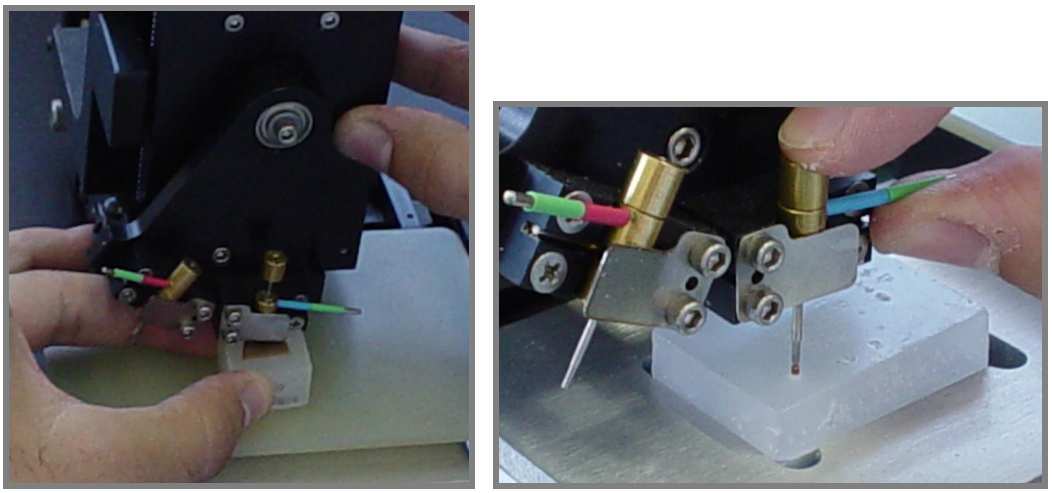

Figura 5. Retirada de material do bloco doador (à esquerda) e montagem do bloco receptor (à direita). (Técnica de *Tissue Microarray,* TMA).

O bloco de TMA é confeccionado com cilindros de 1 mm de diâmetro de cada uma das amostras dos melanomas. Também são incluídas amostras de nevos melanocíticos compostos, que servem de controle das reações. A partir dos blocos de TMA são preparados cortes histológicos seriados em lâminas de vidro, utilizadas para reação imuno-histoquímica das proteínas do ciclo da apoptose celular.

Para o estudo imuno-histoquímico, de acordo com o protocolo de reações a seguir descrito, foram utilizados os seguintes anticorpos para proteínas do ciclo da apoptose celular:

- *Monoclonal mouse anti-human Bcl-2* (Dako), para identificação da expressão de Bcl-2, com diluição 1/200.

- Anticorpo policlonal (Dako), para identificação da expressão de Bax, com diluição 1/200, e de Bak, com diluição 1/150.

- Anticorpo policlonal de coelho (Novocastra), para identificação da expressão de *Apoptosis Protease Activating Factor-1* (Apaf-1), com diluição 1/50.

- Anticorpo policlonal (*Cell Signaling*), para identificação da expressão de Caspase-3 clivada, com diluição 1/100.

- Anticorpo monoclonal (Santa Cruz), para identificação da expressão de Caspase-9, com diluição 1/500.

- Anticorpo monoclonal (Novocastra), para identificação da expressão de Caspase-8, com diluição 1/100.

- Anticorpo monoclonal (Novocastra), para identificação da expressão de FasL, com diluição 1/50.

- Anticorpo monoclonal (Dako) para identificação da expressão de Fas, com diluição 1/1500.

Os cortes dos tecidos foram deixados em estufa a 60º *overnight*. Em seguida, foram submetidos à desparafinização em xilol, com três banhos de cinco minutos cada, a temperatura ambiente, e passagens sucessivas em etanol por 30 segundos (100%, 95% e 70%) e lavagem em água corrente por cinco minutos.

As lâminas foram submetidas à recuperação antigênica pelo calor, utilizado em panela de pressão controlada por microprocessador (Pascal) em

solução citrato 10 mM e pH 6,0, após despressurização e resfriamento com lavagem em água corrente por cinco minutos, exceto pelas lâminas para reação com Caspase 3 clivada, que foram recuperadas por calor e banho-maria a 96º por 40 minutos, e solução de EDTA/TRIS, pH 9.

No passo seguinte, realizou-se bloqueio da peroxidase endógena com solução de peróxido de hidrogênio a 3% (água oxigenada 10 vol.), com quatro trocas em intervalos de cinco minutos, seguidas de lavagens com solução salina tamponada com fosfatos (PBS - *Phosphate Buffered Saline,* 10 mM e pH 7,2) por cinco minutos.

Procedeu-se, então, à incubação das lâminas com o anticorpo primário diluído em título pré-estabelecido, em diluente de anticorpo (DAKO) por duas horas, em temperatura ambiente. Após a incubação, as lâminas foram lavadas em tampão PBS com três trocas em intervalos de cinco minutos.

As reações foram amplificadas pelo sistema Envision G2 AP, exceto para expressão de Fas. Por não ser possível a sua reação com fosfatos, para o Fas foi utilizado o substrato cromógeno DAB (diamino bendizina), e a amplificação foi realizada com o Sistema de Detecção Advance HRP (Dako).

Para a amplificação das reações (exceto para Fas), as lâminas foram incubadas por 30 minutos em temperatura ambiente para cada reagente [Rabbit/Mouse (Link) e AP Enzyme (enhancer)], seguida de lavagens em PBS com três trocas de cinco minutos cada. As lâminas foram, então, incubadas com Permanent Red/Levamisole por 15 minutos em temperatura ambiente, lavadas em PBS por dois minutos, seguida de três trocas de água destilada, contra-coradas com hematoxilina de Harris por 30 segundos, e

finalizadas com lavagens em água corrente por três minutos, secas ao ar e montadas em meio permanente.

As lâminas com anticorpo para Fas foram amplificadas com incubações de 15 minutos para cada um de seus reagentes, seguidas de lavagem em PBS com três trocas de cinco minutos cada. A seguir, foram incubadas com substrato cromógeno líquido DAB por cinco minutos em temperatura ambiente, e lavadas em água corrente por cinco minutos, contra-coradas com Hematoxilina de Harris (Merk) por dois minutos, e novamente lavadas com água corrente por cinco minutos. Na seqüência, foram desidratadas em etanol (79%, 80%, 95% e 100%), passadas em três banhos de xilol e montadas para leitura.

As reações foram acompanhadas de controle positivo (Figura 6), em tecido sabidamente positivo para o anticorpo testado, e de controle negativo, realizado pela omissão do anticorpo primário.

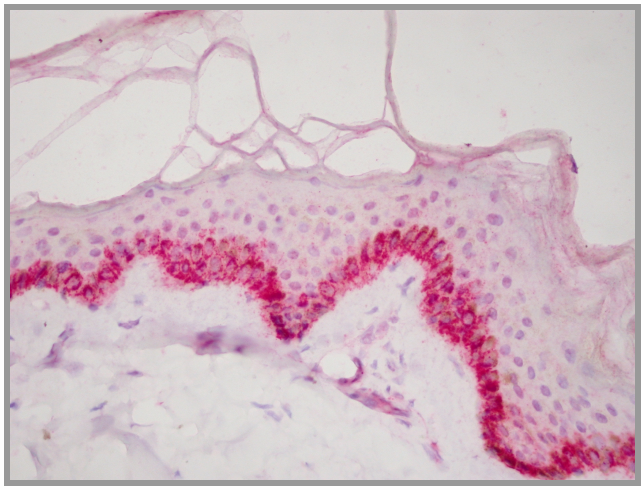

Figura 6. Lâmina de controle positivo para Apaf-1. (Aumento de 400x).

O mesmo procedimento foi realizado com dez nevos-controle, provenientes de pacientes de clínica privada e do Hospital Brigadeiro atendidos no período de 2006 a 2007.

4.2.1 Leitura da expressão protéica

A análise da expressão imuno-histoquímica das proteínas foi realizada quantitativamente através da leitura automatizada por equipamento específico ACIS III (DAKO ACIS III versão 1.01.405, System Dynamics, Inc., CA, EUA) do laboratório do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital A. C. Camargo. Este equipamento acopla um sistema de digitalização de imagens através de uma unidade de aumento com cinco lentes, e funcionamento eletronicamente programado, a um computador com programa especifico para esta função (Figuras 7 e 8).

Figura 7. Imagem fotográfica do equipamento ACIS III acoplado a computador.

Figura 8. Imagem fotográfica do monitor de vídeo mostrando janela produzida pelo programa específico para o equipamento ACIS III.

Para a análise da expressão protéica foi utilizado o programa computacional *cytoplasma_histo*, residente no sistema, que mede a intensidade de reação no citoplasma. Para a análise da expressão de Fas e FasL, foi também utilizado o programa computacional *membrane_histo*, igualmente residente no sistema e que faz a análise da densidade óptica do componente de membrana.

A imagem das lâminas foi capturada digitalmente e armazenada na unidade de disco rígido do computador, em diretórios previamente designados para cada uma das proteínas em estudo. Para cada proteína, criou-se um *treshold* padrão de distribuição dos tecidos corados pelo reagente em vermelho (Fas em marrom) e dos tecidos não corados que se apresentam em cor azul, nas próprias lâminas em estudo (Ver imagens em Resultados).

Estas lâminas foram analisadas por meio de imagem magnificada campo por campo, que permite discriminação do detalhe histológico, marcando-se os pontos com presença de células tumorais para uma leitura au-

tomatizada da expressão protéica. Nesta amostragem foram marcados cinco locais em cada amostra tecidual, obtendo-se assim sua expressão em relação ao padrão previamente determinado.

Para cada ponto assinalado, o programa específico desse sistema fornece um número que expressa o tecido com marcador presente, outro que expressa o tecido sem marcador, o cálculo da porcentagem do tecido marcado em relação ao tecido total, e a intensidade luminosa refletida pelo tecido examinado. Todos estes dados referentes às lâminas de um arquivo e, portanto, de uma das proteínas em estudo, foram levantados e armazenados para posterior leitura.

Para cada amostra tecidual em corte convencional foi calculada a média dos valores obtidos nos cinco pontos marcados. No caso das amostras do TMA, feito em duplicata com duas amostras do bloco original, foram analisadas duas lâminas para cada proteína, e obtida a média dos dados válidos (no mínimo cinco leituras, podendo chegar a um máximo de vinte).

Os detalhes da técnica de escaneamento e da quantificação da intensidade podem ser conhecidos no *site* do fabricante, a saber: http://www.chromavision.com. As reações são expressas por densidade óptica em escala de 0 a 255.

4.2.2 Método estatístico

Os dados epidemiológicos foram descritos em freqüências ou em médias e desvios-padrão, e comparados, respectivamente, com a aplicação da

Prova do Qui-quadrado (ou com o Teste Exato de Fisher, conforme o número total dos grupos de comparação) ou com o Teste *t* de Student. Correlações foram realizadas com a aplicação do Coeficiente de Pearson para amostras pareadas.

O estudo do tempo livre da doença e do tempo de sobrevida foi realizado por Análise Actuarial, confirmada pelo Produto de Kaplan-Meier[16]. Nessa análise foram incluídos apenas os melanomas $\geq$ 1mm.

Para o estudo das porcentagens de expressão de cada proteína da apoptose estudada, os valores fornecidos pelo sistema incluíram a área corada pelo reagente, a área não corada pelo reagente, a intensidade da área corada e a porcentagem da área corada (em relação à área total examinada), conforme apresentados nos Anexos 4 a 15.

Para o cálculo dos escores compostos (EC), que compuseram os dados para a análise estatística, multiplicou-se o valor médio relativo à intensidade da área corada pelo valor médio da porcentagem de área corada[41].

Os EC de expressão das proteínas da apoptose de cada caso foram transformados em médias e desvios-padrão para cada grupo de estudo, a saber: nevos-controle, grupo geral de melanomas, grupo de melanomas < 1 mm e grupo de melanomas $\geq$ 1 mm de espessura, e grupos de evolução (melanomas disseminados ou não disseminados). As médias foram comparadas com a aplicação do estudo da variância das amostras e posterior aplicação da fórmula correspondente ao nível de variância (F) do Teste *t* de Student.

Por fim, tendo em vista a grande diferença nas variâncias dos valores,

adotou-se o valor mediano dos EC obtidos do grupo de nevos-controle como valor de corte para determinação do padrão da expressão de cada proteína estudada em tecido não neoplásico; criaram-se freqüências maiores e menores do que esse valor mediano para os grupos de melanomas < 1 mm e $\geq$ 1 mm de espessura e para os grupos de evolução (melanomas disseminados ou não disseminados), freqüências essas que foram comparadas com prova do Qui-quadrado com correção de continuidade (ou com o Teste Exato de Fisher, conforme a distribuição final de cada grupo de estudo).

Para a análise dos resultados, adotou-se probabilidade para rejeição da hipótese de 95% ($p \leq 0,05$).

5. Resultados

5.1 Resultados epidemiológicos

Os achados epidemiológicos que resultaram do levantamento realizado a partir dos dados de prontuários de 69 pacientes tratados cirurgicamente por melanoma cutâneo primário estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Achados clínicos e epidemiológicos em um grupo de 69 pacientes com melanoma cutâneo primário.

Variáveis	Idades (médias e desvios-padrão)		
	Homens	**Mulheres**	**Grupo geral**
	40,6%	59,4%	
Idade (média ± desvio padrão)	58,4±16,1 anos	57,8±17,7 anos	58,0±17,0 anos
Décadas de vida			
- até a 3ª	7,1%	7,3%	7,2%
- 4ª	7,1%	14,6%	11,6%
- 5ª	10,8%	19,6%	15,9%
- 6ª	21,4%	7,3%	13,1%
- 7ª	35,7%	21,9%	27,6%
- 8ª	10,8%	19,6%	15,9%
- 9ª	7,1%	9,7%	8,7%
Local da lesão			
- Cabeça e pescoço	28,6%	19,5%	23,2%
- Membros inferiores	14,4%	38,6%	27,6%
- Membros superiores	14,3%	26,8%	21,8%
- Tronco	42,8%	17,1%	27,4%
Índices de Breslow			
- *in situ*	7,1%	9,8%	8,7%
- < 1 mm	35,7%	48,8%	43,5%
- 1 mm a 2 mm	14,4%	21,9%	18,8%
- 2 mm a 4 mm	35,7%	4,9%	17,4%
- > 4 mm	7,1%	14,6%	11,6%
Níveis de Clark			
- I	7,1%	9,7%	8,7%
- II	17,9%	17,1%	17,5%
- III	53,6%	48,8%	50,7%
- IV	21,4%	12,2%	15,9%
- V	0	12,2%	7,2%

Não houve diferença na freqüência dessa neoplasia quando comparados homens (40,6%) e mulheres (59,4%), apesar de ter sido evidenciada tendência de as mulheres terem sido mais afetadas (p = 0,085).

A média de idade deste grupo de pacientes foi de 58,0±17,0 anos, com variação de 20 a 91 anos. A média de idade dos homens (58,4±16,1) não foi diferente (p = 0,893) da das mulheres (57,8±17,7). Tampouco foi evidenciada diferença (p = 0,433) entre os gêneros, quando os pacientes foram distribuídos de acordo com a década de vida em que se encontravam, ainda que a manifestação da doença nas 6ª e 7ª décadas de vida tenha sido consideravelmente mais freqüente entre os homens (57,1%) do que entre as mulheres (29,3%).

Houve diferença significativa (p = 0,015) na comparação das freqüências relativas à localização da lesão neoplásica distribuídas em relação ao gênero dos pacientes, indicando que lesões em tronco são especialmente mais freqüentes em homens (42,8%), enquanto lesões em membros inferiores agridem mais freqüentemente as mulheres (38,6%). Lesões de cabeça e pescoço e lesões de membros superiores agridem homens e mulheres em freqüências relativamente semelhantes.

A distribuição dos pacientes em relação aos índices de Breslow foi homogênea no grupo geral, ainda que tenha havido maior freqüência de tumores com espessura menor do que 1 mm (52,2%), e, de modo geral, não evidenciou diferenças estatisticamente importantes na comparação entre os gêneros dos pacientes, à exceção das lesões com 2 mm-4 mm, que foram significativamente mais freqüentes no grupo masculino (p = 0,049).

A distribuição das freqüências relativas à classificação de Clark não evidenciou diferenças significativas (p = 0,461) na comparação entre os gêneros dos pacientes. Embora as maiores freqüências tenham se relacionado com o nível III de Clark no grupo geral, não foram evidenciadas diferenças entre as freqüências relativas aos níveis de Clark.

Não foram evidenciadas diferenças entre os gêneros quando foram avaliadas as médias de idade e desvios-padrão em relação à localização das lesões (Tabela 2). Por outro lado, essas médias foram diferentes em cada grupo (masculino, feminino e total), conforme a localização da lesão (Figura 9).

Tabela 2. Médias e desvios-padrão relativos à idade dos pacientes distribuídos de acordo com o sexo em relação à localização das lesões.

Localização das lesões	Idades (médias e desvios-padrão)			Valores de "p"
	Homens	Mulheres	Grupo geral	
Cabeça e pescoço	73,4±8,6	72,6±10,9	73,0±9,5	0,880
Membros inferiores	40,5±11,8	51,9±17,3	49,5±16,7	0,235
Membros superiores	67,7±2,5	62,4±17,9	63,8±15,4	0,352
Tronco	51,2±13,6	46,4±12,3	49,5±13,0	0,451

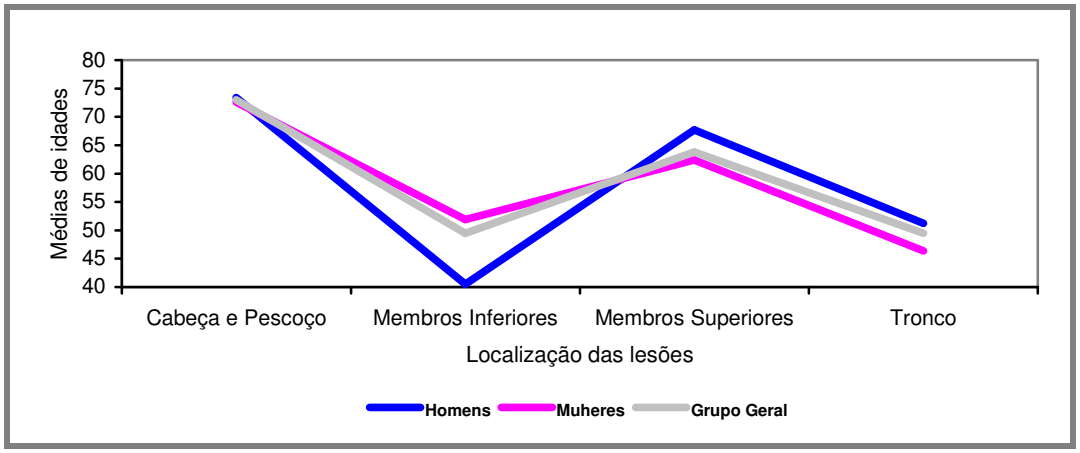

Figura 9. Curvas representativas das médias de idade em relação à localização do melanoma cutâneo primário.

Na análise do comportamento das curvas representativas das médias de idade em relação às localizações da lesão, observou-se no grupo masculino que:

- as lesões em cabeça e pescoço aparecem em idades significativamente mais avançadas do que as lesões de membros inferiores (p = 0,000) e as de tronco (p = 0,000), mas em idade semelhante em relação aos membros superiores (p = 0,948);

- do mesmo modo, as lesões em membros superiores afetam homens significativamente mais idosos do que as lesões de membros inferiores (p = 0,014) e as de tronco (p = 0,007);

- lesões de membros inferiores e de tronco se manifestam em idades similares (p = 0,991).

Tanto no grupo feminino quanto no grupo geral (cujas curvas mostraram comportamentos muito parecidos, mas diferentes em relação ao grupo masculino), evidenciou-se que as lesões em cabeça e pescoço acometem pacientes com idades significativamente mais avançadas do que as lesões de membros inferiores (p = 0,020 e p = 0,000, respectivamente) e as de tronco (p = 0,004 e p = 0,000, respectivamente), mas em idades similares em relação às lesões de membros superiores (p = 0,242 e p = 0,206, respectivamente). Nas demais localizações não foram evidenciadas diferenças significativas.

Não foram evidenciadas diferenças entre os índices de Breslow também no que se refere à média de idade (e desvios-padrão), ressaltando-se, contudo, a grande variância de idades nesses grupos (Tabela 3). De fato,

não houve correlação entre as espessuras dos tumores e as idades dos pacientes (r = 0,11). Não foi observada diferença significativa quando analisados os níveis de Clark em relação às idades dos pacientes (Tabela 3).

Tabela 3. Médias e desvios-padrão relativos à idade dos pacientes distribuídos de acordo com os índices de Breslow e os níveis de Clark.

Índices de Breslow	Idades (médias e desvios-padrão)	Níveis de Clark	Idades (médias e desvios-padrão)
in situ	67,2±8,4	I	67,2±8,4
<1 mm	53,1±17,3	II	55,4±15,4
1-2 mm	59,0±15,8	III	54,7±18,1
2-4 mm	60,7±16,2	IV	67,3±12,9
>4 mm	64,1±21,0	V	56,4±22,3

Houve ampla variação nas freqüências dos índices de Breslow distribuídas conforme a localização das lesões. Na Figura 10, observamos que:

- nas lesões de cabeça e pescoço, houve distribuição homogênea dos índices de Breslow (p = 0,713);

- nas lesões de membros inferiores, houve freqüência significativamente maior (p = 0,023) de tumores com espessura de 1 mm a 2 mm (47,4%);

- nas lesões de membros superiores, 60% dos casos referiam-se a tumores com espessura menor que 1 mm, e essa predominância foi estatisticamente significativa (p = 0,001);

- tumores com espessura menor que 1 mm também foram significativamente predominantes nas lesões de tronco (p = 0,000);

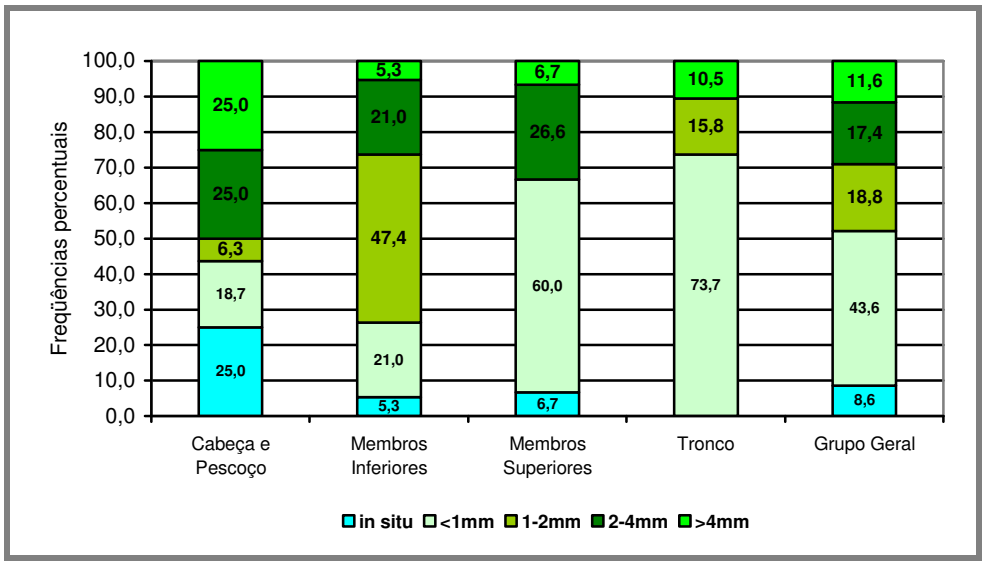

Figura 10. Distribuição das freqüências relativas aos índices de Breslow de acordo com a localização do melanoma cutâneo primário.

A distribuição dos níveis de Clark de acordo com a localização do tumor (Figura 11) evidenciou que:

- nas lesões localizadas em cabeça e pescoço, não houve diferenças na distribuição dessas freqüências (p = 0,579);

- nas lesões em membros inferiores, houve predominância (63,1%) significativa do nível III (p = 0,000);

- nas lesões de membros superiores, a freqüência do nível III (73,3%) foi significativamente maior (p = 0,000) do que todas as demaiso;

- nas lesões de tronco, predominou significativamente o nível III (p = 0,000), e não houve registro dos níveis I e V para essa localização do melanoma cutâneo primário;

- por fim, no grupo geral também houve predominância significativa (p = 0,000) do nível III em relação aos demais níveis de Clark.

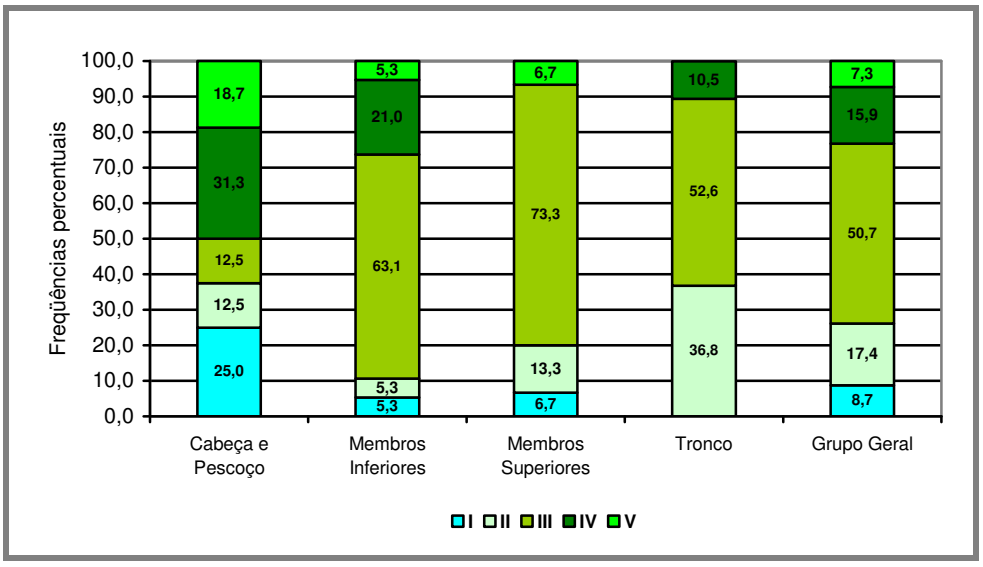

Figura 11. Distribuição das freqüências relativas aos níveis de Clark de acordo com a localização do melanoma cutâneo primário.

De fato, considerando esse mesmo conjunto de variáveis analisado sob outra perspectiva, a distribuição das freqüências apresentou diferenças bastante significativas (p = 0,002), revelando que 66,7% dos tumores no nível I e 60% dos tumores no nível V de Clark estavam localizados na região da cabeça e pescoço; 58,3% dos tumores no nível II, em tronco; e apenas 5,7% dos tumores no nível III, na região da cabeça e pescoço.

A distribuição dos pacientes em relação aos índices de Breslow e aos níveis da Clark está apresentada na Tabela 4.

Tabela 4. Distribuição percentual dos pacientes de acordo com os índices de Breslow e níveis de Clark.

Níveis de Clark	Índices de Breslow				
	In situ	<1mm	1-2mm	2-4mm	>4mm
I	100%	0	0	0	0
II	0	40,0%	0	0	0
III	0	60,0%	69,2%	58,3%	12,5%
IV	0	0	30,8%	41,7%	37,5%
V	0	0	0	0	50,0%

Os achados histológicos desta série de pacientes estão descritos na Tabela 5 apenas a título de informação epidemiológica complementar, já que não constituíram escopo da pesquisa.

Tabela 5. Dados descritivos relativos aos achados histológicos em 69 pacientes com melanoma cutâneo.

Achados histológicos	N	(%)
Tipo histológico*		
Extensivo superficial	49	76,6%
Nodular	8	12,5%
Lentigo maligno	4	6,2%
Acral lentiginoso	3	4,7%
Crescimento**		
Vertical	55	90,2%
Radial	6	9,8%
Ulceração		
Ausente	53	76,8%
Presente	16	23,2%
Mitose**		
0	23	36,5%
1-2	17	26,9%
3-4	11	17,5%
5-6	1	1,6%
7-8	2	3,2%
9-10	3	4,8%
>10	6	9,5%

(*) Cinco casos sem registro do dado. (**) Seis casos sem registro do caso.

Para o estudo da evolução dos pacientes, foram inicialmente excluídos da análise (1) seis pacientes com melanoma cutâneo *in situ* e (2) nove pacientes cujo melanoma foi diagnosticado e tratado a partir de outubro de 2006, de modo a assegurar seguimento mínimo de 24 meses para todos os casos. Assim, dos 54 pacientes considerados, disseminação da doença foi observada em 12 pacientes (22,2%), dos quais nove (16,6%) evoluíram com óbito e os demais três (5,6%) permaneciam vivos até a última consulta.

Não foi observada disseminação da doença em nenhum dos pacientes com melanomas < 1 mm, razão pela qual esses pacientes também foram excluídos da análise da evolução da doença, restando, para tanto, 27 paci-

entes com melanomas ≥ 1 mm, nos quais a taxa de disseminação da doença foi de 44,4%.

Nas Figuras 12 a 14 estão ilustrados casos de melanomas cutâneos primários de diferentes espessuras e em diferentes localizações que evoluíram com disseminação.

Figura 12. Imagem fotográfica dos aspectos pré (à esquerda) e pós-operatório (à direita) de melanoma primário cutâneo em região de cabeça e pescoço, com espessura de 4,2 mm. Caso 12. Disseminação da doença 125 meses após tratamento.

Figura 13. Imagem fotográfica dos aspectos pré (à esquerda) e pós-operatório (à direita) de melanoma primário cutâneo em membro superior, com espessura de 7,0 mm. Caso 43. Disseminação da doença diagnosticada 43 meses após tratamento, seguida de óbito.

Figura 14. Imagem fotográfica do aspecto pós-operatório de melanoma primário cutâneo com espessura de 5,0 mm em região de cabeça e pescoço (acima à esquerda). Caso 44. Disseminação da doença em região cervical (acima à direita), em mão (abaixo à esquerda) e em membro (abaixo à direita) seis meses após tratamento, seguida de óbito.

Não houve diferença entre os gêneros quando analisadas as freqüências de disseminação da doença (p = 0,577), observada em 50% das mulheres e em 53,3% dos homens. A média de idade dos pacientes com doença disseminada (60,7$\pm$21,1) não foi diferente (p = 0,850) da dos pacientes sem recorrência (59,3$\pm$15,2). Tampouco houve diferença na distribuição das freqüências relativas ao local do melanoma (p = 0,950).

As diferenças encontradas na análise da evolução dos pacientes em relação aos índices de Breslow (Tabela 6) se mostraram estatisticamente significativas (p = 0,042), revelando que 50% dos pacientes com doença disseminada apresentavam melanomas com espessura > 4 mm, contra apenas 13,3% dos pacientes sem disseminação da doença. Essa diferença foi igualmente significativa (p = 0,043) quando comparadas as médias dos Índices de Breslow entre melanomas disseminados (4,6$\pm$2,8 mm) e não disseminados (2,6$\pm$2,3 mm).

A freqüência de pacientes com disseminação da doença categorizados nos níveis IV e V de Clark (58,3% e 16,7%, respectivamente) foi maior do que a de pacientes sem disseminação (20,0% e 13,3%, respectivamente), assim como a grande maioria dos pacientes em nível III (66,76%) apresentou boa evolução (Tabela 7). Contudo, essa diferença não se mostrou estatisticamente significativa (p = 0,078).

Tabela 6. Distribuição percentual das freqüências relativas à evolução dos pacientes distribuídos de acordo com os índices de Breslow.

Índices de Breslow	Disseminação da doença		Valor de "p"
	Ausente	Presente	
1-2 mm	60,0%	16,7%	
2-4 mm	26,7%	33,3%	
> 4 mm	13,3%	50,0%	0,042

Tabela 7. Distribuição percentual das freqüências relativas à evolução dos pacientes distribuídos de acordo com os níveis de Clark.

Níveis de Clark	Disseminação da doença		Valor de "p"
	Ausente	Presente	
III	66,7%	25,0%	
IV	20,0%	58,3%	
V	13,3%	16,7%	0,078

O tempo médio decorrido entre a cirurgia e o diagnóstico da disseminação do melanoma foi de 26,7±35,5 meses (oscilando de quatro a 125 meses). Análise actuarial confirmada pelo produto de Kaplan-Meier revelaram taxa de tempo livre da doença de 81% para um ano; 71% para dois anos; e de 63% para cinco anos (Tabela 8; Figura 15).

O tempo médio decorrido entre o diagnóstico e o óbito dos pacientes foi de 24,5±20,7 meses (oscilando de cinco a 67 meses). Os índices de sobrevida calculados por Análise actuarial e pelo produto de Kaplan-Meier revelaram taxa de sobrevida de 85% para um ano; 82% para dois anos; e de 70% para cinco anos (Tabela 9; Figura 15).

Tabela 8. Índices de tempo livre da doença calculados por Análise Actuarial e pelo Produto de Kaplan-Meier.

Análise actuarial		Produto de Kaplan-Meier	
Tempo livre da doença (meses)	Índice cumulativo	Tempo livre da doença (meses)	Índice cumulativo
0 - 6	0,85	4	0,93
		5	0,85
7 - 12	0,81	9	0,81
13 - 24	0,70	13	0,78
		14	0,74
		18	0,71
25 - 36	0,63	25	0,67
		34	0,63
37 - 48	0,63		
49 - 60	0,63		
61 - 72	0,60	65	0,59
73 - 84	0,60		
≥ 85	0,58		
		125	0,56

Tabela 9. Índices de sobrevida calculados por Análise Actuarial e pelo Produto de Kaplan-Meier.

Análise actuarial		Produto de Kaplan-Meier	
Tempo livre da doença (meses)	Índice cumulativo	Tempo livre da doença (meses)	Índice cumulativo
0 - 6	0,97	5	0,97
		6	0,93
7 - 12	0,85	10	0,89
		12	0,85
13 - 24	0,82	15	0,82
25 - 36	0,74	28	0,78
		35	0,74
37 - 48	0,70	43	0,70
49 - 60	0,70		
61 - 72	0,66	67	0,66

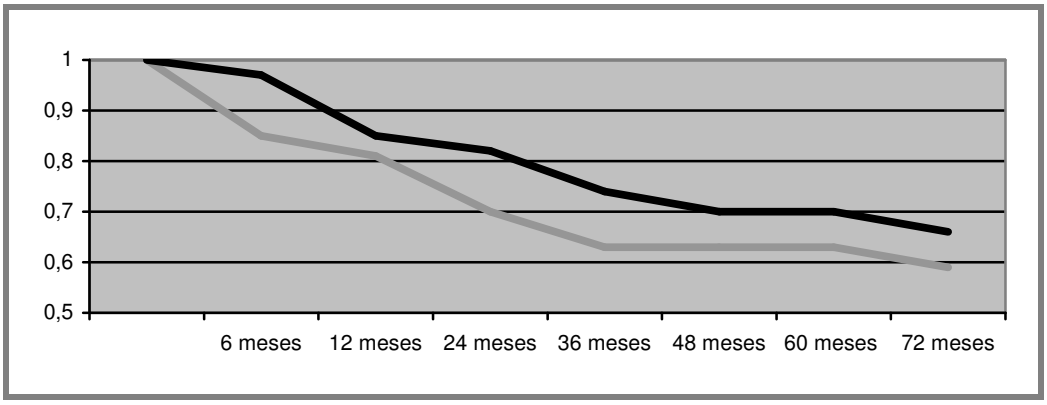

Figura 15. Curva actuarial do tempo livre da doença (linha cinza) e do tempo de sobrevida (linha preta) após tratamento de melanomas ≥ 1 mm.

5.2 Expressão protéica nos melanomas cutâneos primários

Os valores médios relativos à porcentagem e à intensidade de expressão de cada proteína da apoptose nos diferentes grupos de estudo se encontram no Anexo 16.

5.2.1 Bcl-2

A Figura 16 ilustra lâminas de TMA para estudo da expressão de Bcl2 em nevo-controle e em melanoma.

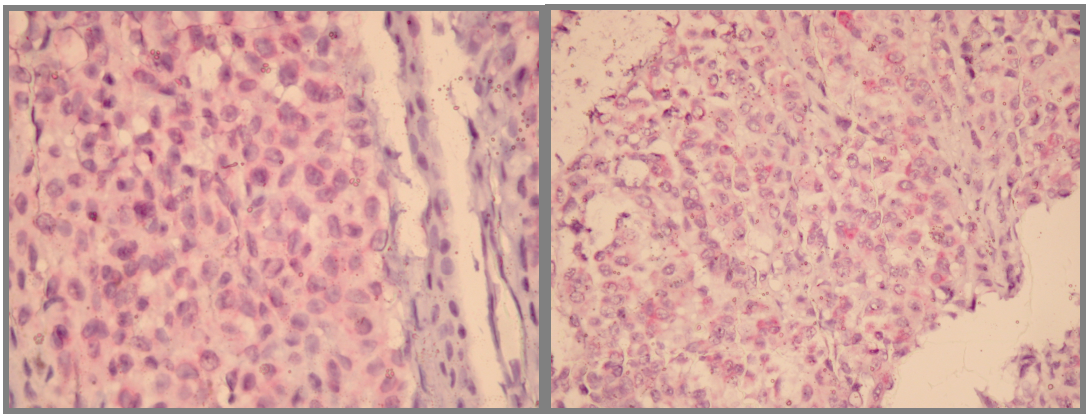

Figura 16. Imagem fotográfica das lâminas de TMA para estudo da expressão de Bcl2 em nevo-controle (à esquerda) e em melanoma com espessura de 2,8 mm (à direita). Caso 68. (Aumento de 400x).

O estudo dos EC médios relativos à Bcl2 (Tabela 10) não evidenciou diferenças entre os nevos-controle e os demais grupos de estudo, mas revelou que a expressão dessa proteína foi significativamente menor nos melanomas $\geq$ 1 mm (1,6%) em relação aos < 1 mm (8,8%).

Esse achado foi ratificado quando comparadas as freqüências relativas ao valor mediano observado nos nevos-controle, indicando freqüência significativamente maior de amostras de melanomas < 1mm com valores maiores que o padrão não neoplásico para Bcl2 (78,3%) do que de amostras de melanomas ≥ 1 mm (36,4%), conforme representação na Figura 17.

Tabela 10. Valores descritivos relativos às médias±desvios-padrão dos escores compostos de expressão da Bcl2 nos diferentes grupos de estudo.

Escores compostos	Nevos-controle	Melanomas		
		Geral	< 1mm	≥ 1mm
Menor valor	0,1	0,1	0,1	0,0
Maior valor	12,1	62,2	62,2	12,1
Média	3,8	5,2	8,8	1,6
Desvio-padrão	4,0	10,6	13,8	2,9
Mediana	2,2	0,7	4,5	0,4

		Estatística:		
			F*	p**
Controles		Melanomas	0,003	0,431
		Melanomas < 1 mm	0,000	0,069
		Melanomas ≥ 1 mm	0,153	0,058
Melanomas < 1 mm		Melanomas ≥ 1 mm	0,000	**0,005**

(*) Comparação das variâncias; (**) Comparação das médias e desvios-padrão: Teste t de Sudent

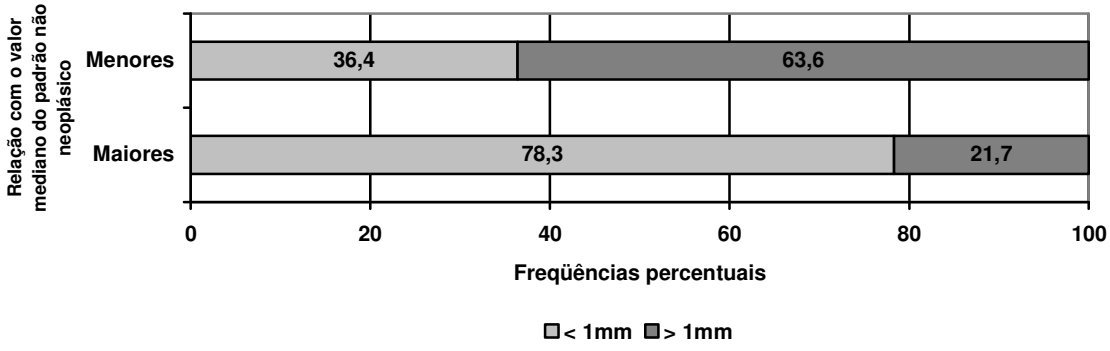

Figura 17. Representação gráfica da distribuição das freqüências relativas ao valor mediano do padrão não neoplásico da Bcl2 de acordo com a espessura dos melanomas (< ou ≥ 1mm). χ^2 = 17,88; 1 grau de liberdade; p = 0,000.

5.2.2 BAX

A Figura 18 ilustra lâminas de TMA para estudo da expressão de BAX em nevo-controle e em melanoma.

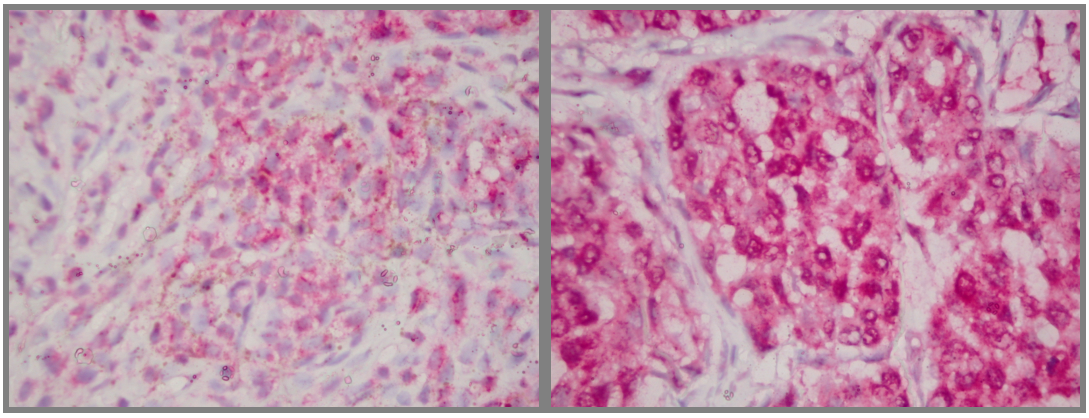

Figura 18. Imagem fotográfica das lâminas de TMA para estudo da expressão de BAX em nevo-controle (à esquerda) e em melanoma com espessura de 4,2 mm (à direita). Caso 12. (Aumento de 400x).

O estudo dos EC médios relativos a BAX (Tabela 12) evidenciou que a expressão dessa proteína foi significativamente maior nos melanomas $\geq$ 1 mm (45,2%) em relação aos nevos-controle (24,3%), mas sem diferenças entre os demais grupos de estudo.

Todavia, observou-se forte tendência (p = 0,057) de a porcentagem média de expressão de BAX ser maior nos melanomas $\geq$ 1 mm em relação aos < 1mm (Tabela 11).

De fato, a freqüência de valores maiores do que o valor mediano do padrão não neoplásico BAX foi significativamente maior (p = 0,009) nos melanomas $\geq$ 1mm (57,5%) do que nos melanomas < 1 mm (27,3%), conforme representação na Figura 19.

Tabela 11. Valores descritivos relativos às médias±desvios-padrão dos escores compostos de expressão da BAX nos diferentes grupos de estudo.

Escores compostos	Nevos-controle	Melanomas		
		Geral	< 1mm	≥ 1mm
Menor valor	2,7	0	0	0
Maior valor	52,2	101,8	76,9	101,8
Média	24,3	39,0	33,3	45,2
Desvio-padrão	18,1	26,2	25,7	25,6
Mediana	26,4	42,0	38,0	43,3

		Estatística:	
		F*	p**
Controles	Melanomas	0,213	0,090
	Melanomas < 1 mm	0,264	0,306
	Melanomas ≥ 1 mm	0,275	**0,020**
Melanomas < 1 mm	Melanomas ≥ 1 mm	0,972	0,057

(*) Comparação das variâncias; (**) Comparação das médias e desvios-padrão: Teste t de Sudent

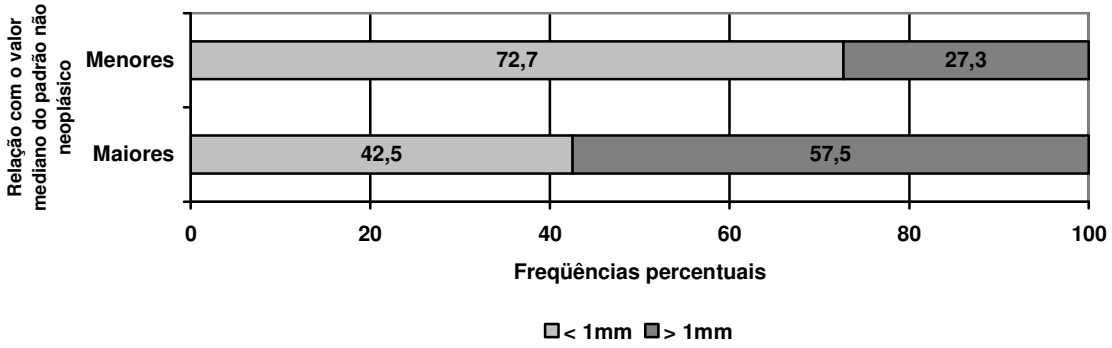

Figura 19. Representação gráfica da distribuição das freqüências relativas ao valor mediano do padrão não neoplásico da BAX de acordo com a espessura dos melanomas (< ou ≥ 1mm). χ^2 = 6,74; 1 grau de liberdade; p = 0,009.

5.2.3 BAK

A Figura 20 ilustra lâminas de TMA para estudo da expressão de BAK em nevo-controle e em melanoma.

O estudo dos EC médios relativos a BAK (Tabela 12) evidenciou que a expressão dessa proteína foi significativamente menor nos nevos-controle em comparação a todos os demais grupos de estudo. Não houve diferença entre os melanomas ≥ 1 mm e < 1mm quando comparadas tanto as porcentagens médias (Tabela 12) quanto as freqüências relativas ao valor mediano

do padrão não neoplásico dessa proteína (Figura 21).

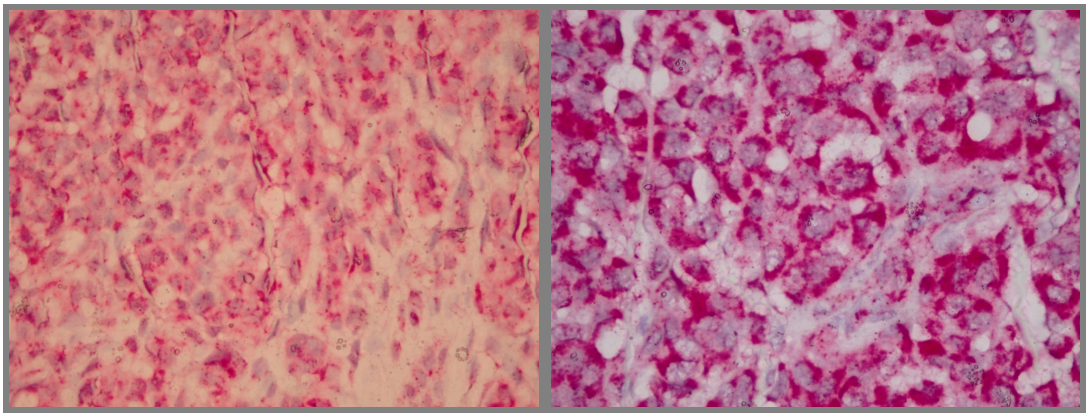

Figura 20. Imagem fotográfica das lâminas de TMA para estudo da expressão de BAK em nevo-controle (à esquerda) e em melanoma com espessura de 2,8 mm (à direita). Caso 68. (Aumento de 400x).

Tabela 12. Valores descritivos relativos às médias±desvios-padrão dos escores compostos de expressão da BAK nos diferentes grupos de estudo.

Escores compostos	Nevos-controle	Melanomas		
		Geral	< 1mm	≥ 1mm
Menor valor	14,2	0,0	0,0	13,1
Maior valor	49,4	96,4	79,9	96,9
Média	23,5	48,7	47,8	49,6
Desvio-padrão	13,7	19,1	18,3	20,2
Mediana	23,1	50,7	49,8	51,5

		Estatística:	
		F*	p**
Controles	Melanomas	0,275	**0,000**
	Melanomas < 1 mm	0,397	**0,000**
	Melanomas ≥ 1 mm	0,193	**0,000**
Melanomas < 1 mm	Melanomas ≥ 1 mm	0,410	0,676

(*) Comparação das variâncias; (**) Comparação das médias e desvios-padrão: Teste t de Sudent

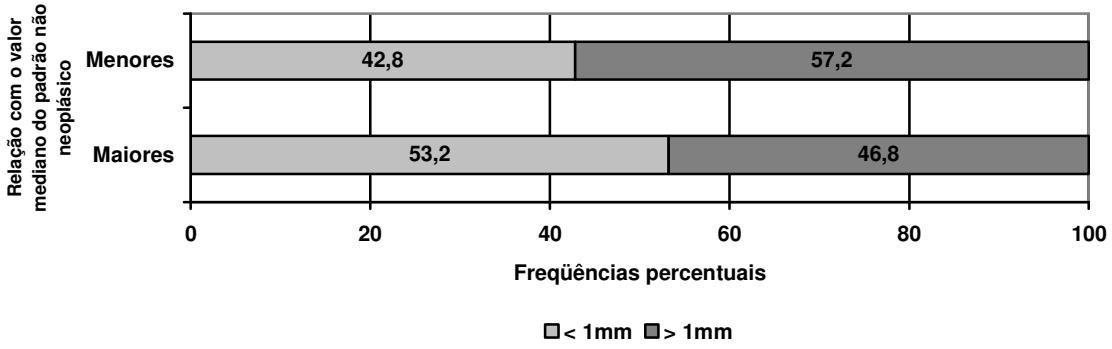

Figura 21. Representação gráfica da distribuição das freqüências relativas ao valor mediano do padrão não neoplásico da BAK de acordo com a espessura dos melanomas (< ou ≥ 1mm). χ^2 = 0,014; 1 grau de liberdade; p = 0,905.

5.2.4 Apaf-1

A Figura 22 ilustra lâminas de TMA para estudo da expressão de BAK em nevo-controle e em melanoma.

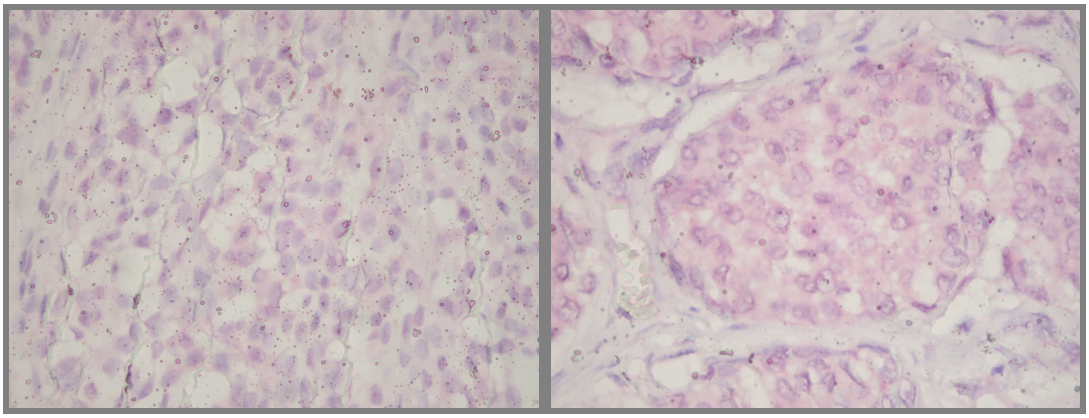

Figura 22. Imagem fotográfica das lâminas de TMA para estudo da expressão de Apaf-1 em nevo-controle (à esquerda) e em melanoma com espessura de 2,8 mm (à direita). Caso 68. (Aumento de 400x).

O estudo dos EC médios relativos a Apaf-1 (Tabela 13) evidenciou que a expressão dessa proteína foi significativamente menor nos nevos-controle em comparação a todos os demais grupos de estudo. Por outro lado, a porcentagem média de expressão dessa proteína foi significativamente menor nos melanomas $\geq$ 1 mm, em relação aos melanomas < 1 mm.

No entanto, a distribuição das freqüências relativas ao valor mediano do padrão não neoplásico de Apaf-1 não evidenciou diferenças significativas quando comparados os grupos de melanomas pela espessura da lesão, nos quais foram similares os valores maiores e menores ao do padrão não neoplásico (Figura 23).

Tabela 13. Valores descritivos relativos às médias±desvios-padrão dos escores compostos de expressão da Apaf-1 nos diferentes grupos de estudo.

Escores compostos	Nevos-controle	Melanomas		
		Geral	< 1mm	≥ 1mm
Menor valor	0,8	0,9	0,0	0,9
Maior valor	81,0	60,2	60,2	41,6
Média	3,5	26,3	35,1	16,8
Desvio-padrão	2,5	16,8	16,2	11,6
Mediana	2,8	27,6	39,2	16,4

		Estatística:		
			F*	p**
Controles	Melanomas		0,000	**0,000**
	Melanomas < 1 mm		0,000	**0,000**
	Melanomas ≥ 1 mm		0,000	**0,000**
Melanomas < 1 mm	Melanomas ≥ 1 mm		0,059	**0,000**

(*) Comparação das variâncias; (**) Comparação das médias e desvios-padrão: Teste t de Sudent

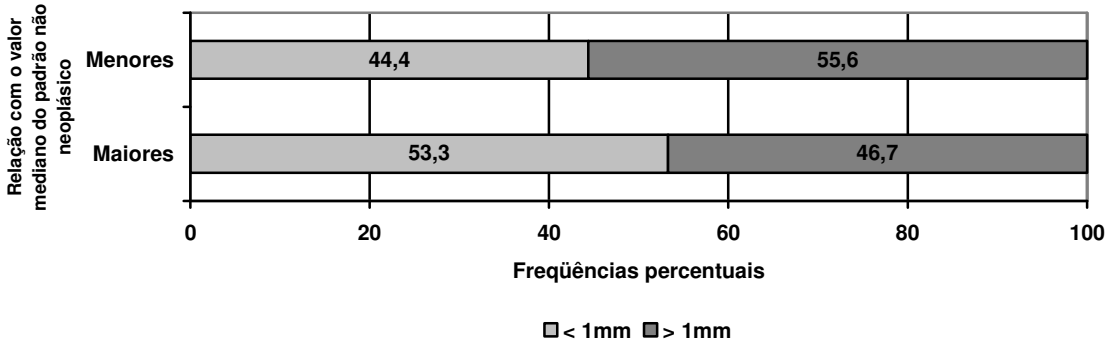

Figura 23. Representação gráfica da distribuição das freqüências relativas ao valor mediano do padrão não neoplásico da Apaf-1 de acordo com a espessura dos melanomas (< ou ≥ 1mm). χ^2 = 0,019; 1 grau de liberdade; p = 0,890.

5.2.5 Caspase3 (citoplasma)

A Figura 24 ilustra lâminas de TMA para estudo da expressão de Caspase3 em nevo-controle e em melanoma.

O estudo dos EC médios relativos a Caspase3 (citoplasma) evidenciou que a expressão dessa proteína foi significativamente menor nos nevos-controle em comparação aos demais grupos (Tabela 14). Não houve diferença nas porcentagens médias de expressão dessa proteína quando comparados os grupos de melanomas ≥ 1 mm e < 1 mm, mas ficou evidente que

a freqüência de valores maiores do que o valor do padrão não neoplásico foi significativamente maior (p = 0,000) nos melanomas ≥ 1 mm (Figura 25).

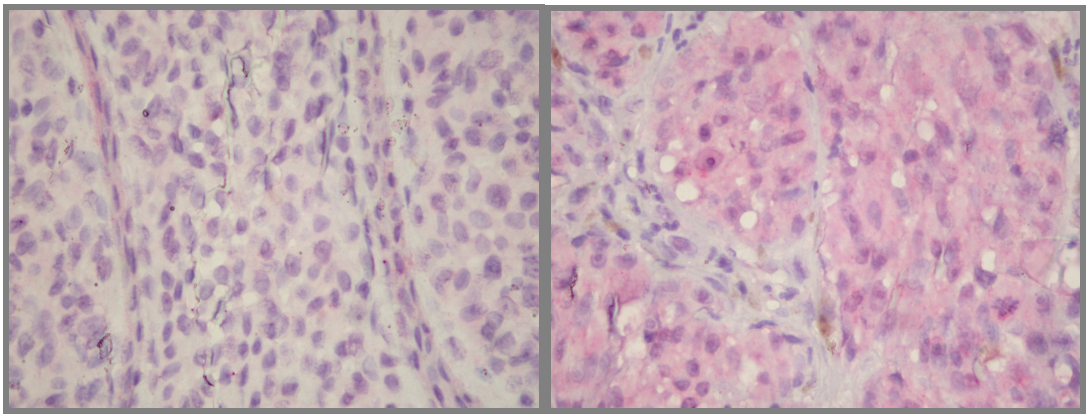

Figura 24. Imagem fotográfica das lâminas de TMA para estudo da expressão de Caspase3 em nevo-controle (à esquerda) e em melanoma com espessura de 4,2 mm (à direita). Caso 12. (Aumento de 400x).

Tabela 14. Valores descritivos relativos às médias±desvios-padrão dos escores compostos de expressão da Caspase3 (citoplasma) nos diferentes grupos de estudo.

Escores compostos	Nevos-controle	Melanomas		
		Geral	< 1mm	≥ 1mm
Menor valor	0,7	0	0	0
Maior valor	5,7	54,8	54,8	43,4
Média	2,4	14,6	11,2	18,2
Desvio-padrão	1,7	16,7	19,5	12,1
Mediana	1,6	7,1	0	17,1

	Estatística:	F*	p**
Controles	Melanomas	0,000	**0,000**
	Melanomas < 1 mm	0,000	**0,010**
	Melanomas ≥ 1 mm	0,000	**0,000**
Melanomas < 1 mm	Melanomas ≥ 1 mm	0,007	0,078

(*) Comparação das variâncias; (**) Comparação das médias e desvios-padrão: Teste t de Sudent

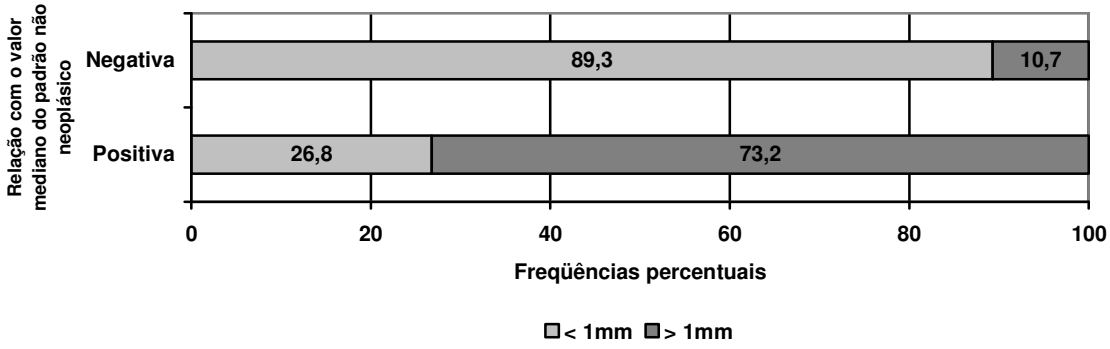

Figura 25. Representação gráfica da distribuição das freqüências relativas ao valor mediano do padrão não neoplásico da Caspase3 (citoplasma) de acordo com a espessura dos melanomas (< ou ≥ 1mm). χ^2 = 28,57; 1 grau de liberdade; p = 0,000.

5.2.6 Caspase9 (citoplasma)

A Figura 26 ilustra lâminas de TMA para estudo da expressão de Caspase9 em nevo-controle e em melanoma.

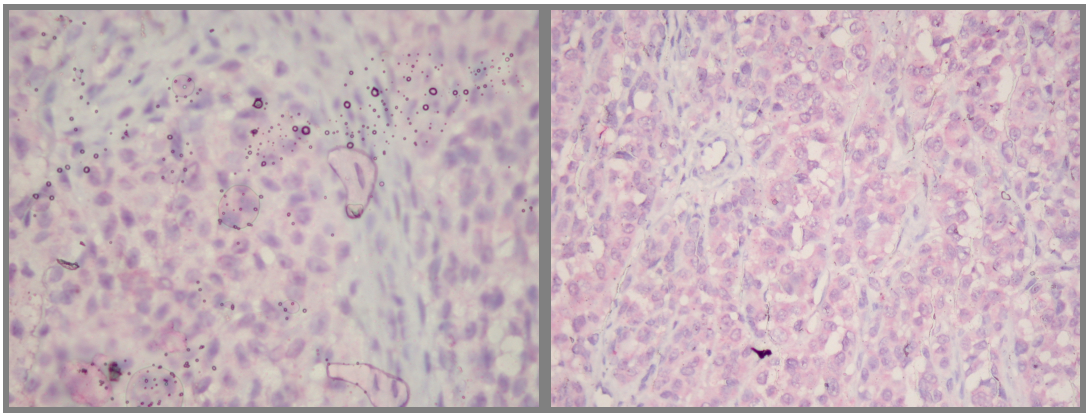

Figura 26. Imagem fotográfica das lâminas de TMA para estudo da expressão de Caspase9 em nevo-controle (à esquerda) e em melanoma com espessura de 2,8 mm (à direita). Caso 68. (Aumento de 400x).

O estudo dos EC médios relativos a Caspase9 (citoplasma) evidenciou que a expressão dessa proteína foi significativamente menor nos nevos-controle em comparação a todos os demais grupos de estudo (Tabela 15). Por outro lado, a porcentagem média de expressão dessa proteína foi significativamente menor nos melanomas $\geq$ 1 mm em relação aos melanomas < 1 mm.

No entanto, a distribuição das freqüências relativas ao valor mediano do padrão não neoplásico de Caspase9 (citoplasma) não evidenciou diferenças significativas quando comparados os grupos de melanomas pela espessura da lesão, nos quais foram similares os valores maiores e menores ao valor do padrão não neoplásico (Figura 27).

Tabela 15. Valores descritivos relativos às médias±desvios-padrão dos escores compostos de expressão da Caspase9 (citoplasma) nos diferentes grupos de estudo.

Escores compostos	Nevos-controle	Melanomas		
		Geral	< 1mm	≥ 1mm
Menor valor	0,4	4,4	0	4,4
Maior valor	18,8	49,4	49,4	39,6
Média	7,9	23,6	28,7	18,0
Desvio-padrão	6,1	13,2	13,8	10,1
Mediana	6,3	22,1	28,9	17,2

		Estatística:		
			F*	p**
Controles	Melanomas		0,017	**0,000**
	Melanomas < 1 mm		0,013	**0,010**
	Melanomas ≥ 1 mm		0,119	**0,004**
Melanomas < 1 mm	Melanomas ≥ 1 mm		0,071	**0,000**

(*) Comparação das variâncias; (**) Comparação das médias e desvios-padrão: Teste t de Sudent

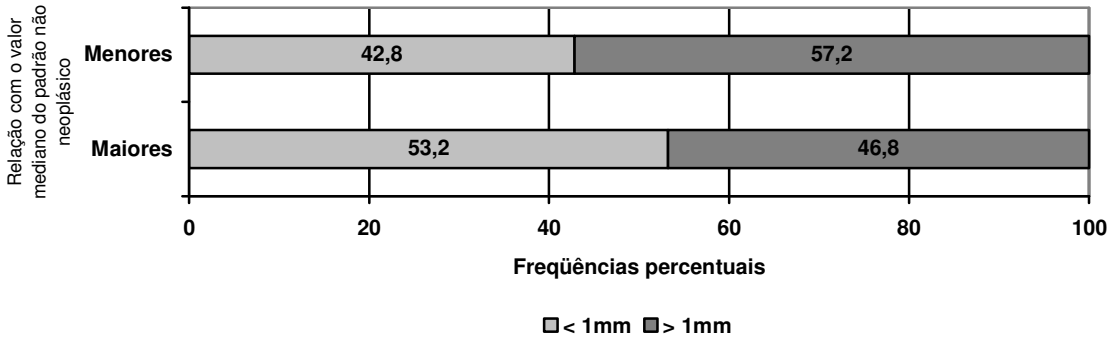

Figura 27. Representação gráfica da distribuição das freqüências relativas ao valor mediano do padrão não neoplásico da Caspase9 (citoplasma) de acordo com a espessura dos melanomas (< ou ≥ 1mm). χ^2 = 0,01; 1 grau de liberdade; p = 0,950.

5.2.7 Caspase8 (citoplasma)

A Figura 28 ilustra lâminas de TMA para estudo da expressão de Caspase8 em nevo-controle e em melanoma.

O estudo dos EC médios relativos a Caspase8 (citoplasma) evidenciou que a expressão dessa proteína foi significativamente menor nos nevos-controle em comparação a todos os demais grupos de estudo (Tabela 16). Não houve diferença entre os melanomas ≥ 1 mm e < 1mm (Tabela 16; Figura 29).

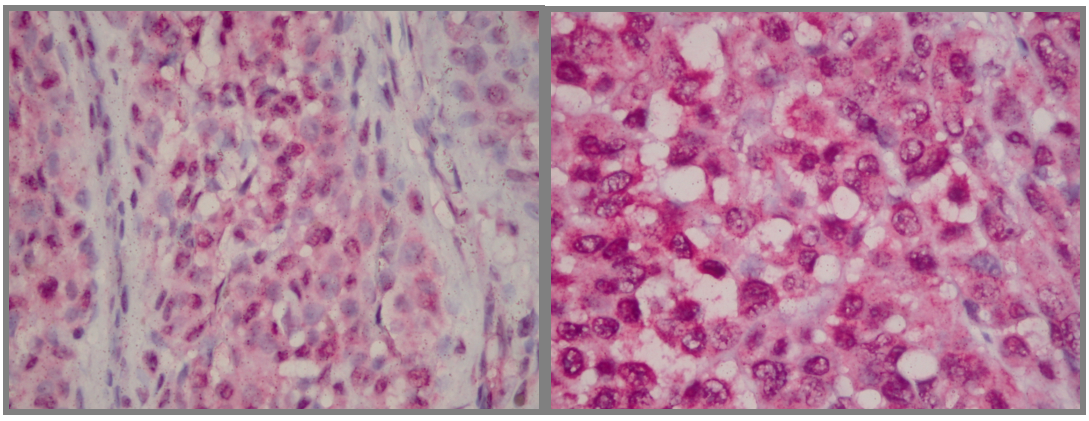

Figura 28. Imagem fotográfica das lâminas de TMA para estudo da expressão de Caspase8 em nevo-controle (à esquerda) e em melanoma com espessura de 2,8 mm (à direita). Caso 68. (Aumento de 400x).

Tabela 16. Valores descritivos relativos às médias±desvios-padrão dos escores compostos de expressão da Caspase8 (citoplasma) nos diferentes grupos de estudo.

Escores compostos	Nevos-controle	Melanomas		
		Geral	< 1mm	≥ 1mm
Menor valor	10,4	4,2	0,0	4,2
Maior valor	54,2	116,8	104,4	116,8
Média	24,6	52,4	56,3	48,1
Desvio-padrão	13,0	28,4	29,6	26,9
Mediana	24,0	57,9	62,8	48,5

		Estatística:		
			F*	p**
Controles	Melanomas		0,015	**0,000**
	Melanomas < 1 mm		0,013	**0,000**
	Melanomas ≥ 1 mm		0,026	**0,000**
Melanomas < 1 mm	Melanomas ≥ 1 mm		0,585	0,234

(*) Comparação das variâncias; (**) Comparação das médias e desvios-padrão: Teste t de Sudent

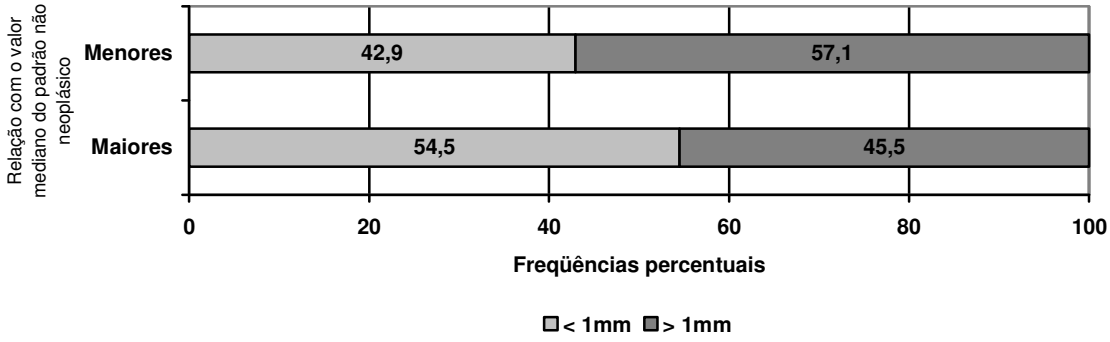

Figura 29. Representação gráfica da distribuição das freqüências relativas ao valor mediano do padrão não neoplásico da Caspase8 (citoplasma) de acordo com a espessura dos melanomas (< ou ≥ 1mm). χ^2 = 0,23; 1 grau de liberdade; p = 0,631.

5.2.8 FasL (membrana)

O estudo dos EC médios relativos a FasL (membrana) evidenciou que a expressão dessa proteína foi significativamente menor nos nevos-controle em comparação a todos os demais grupos de estudo. Por outro lado, a porcentagem média de expressão dessa proteína foi significativamente menor nos melanomas $\geq$ 1 mm em relação aos melanomas < 1 mm (Tabela 17).

Tabela 17. Valores descritivos relativos às médias±desvios-padrão dos escores compostos de expressão da FasL (membrana) nos diferentes grupos de estudo.

Escores compostos	Nevos-controle	Melanomas		
		Geral	< 1mm	≥ 1mm
Menor valor	0,9	13,5	13,5	0,8
Maior valor	8,1	68,1	68,1	67,4
Média	2,7	37,5	48,2	27,8
Desvio-padrão	2,2	18,6	14,3	16,7
Mediana	2,3	40,3	50,1	23,2

		Estatística:	
		F*	p**
Controles	Melanomas	0,000	**0,000**
	Melanomas < 1 mm	0,000	**0,000**
	Melanomas ≥ 1 mm	0,000	**0,000**
Melanomas < 1 mm	Melanomas ≥ 1 mm	0,409	**0,000**

(*) Comparação das variâncias; (**) Comparação das médias e desvios-padrão: Teste t de Sudent

No entanto, a distribuição das freqüências relativas ao valor mediano do padrão não neoplásico de FasL (membrana) não evidenciou diferenças significativas quando comparados os grupos de melanomas pela espessura da lesão, nos quais essas freqüências foram similares (Figura 30).

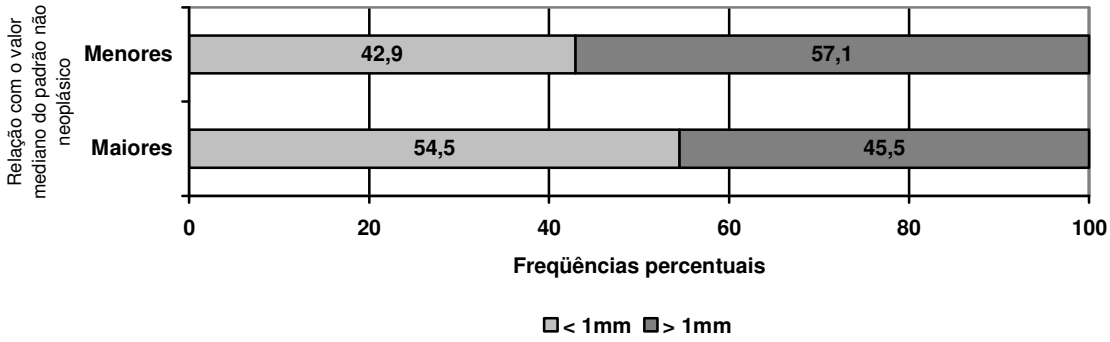

Figura 30. Representação gráfica da distribuição das freqüências relativas ao valor mediano do padrão não neoplásico da FasL (membrana) de acordo com a espessura dos melanomas (< ou ≥ 1mm). χ^2 = 0,42; 1 grau de liberdade; p = 0,516.

5.2.9 FasL (citoplasma)

A Figura 31 ilustra lâminas de TMA para estudo da expressão de FasL em nevo-controle e em melanoma.

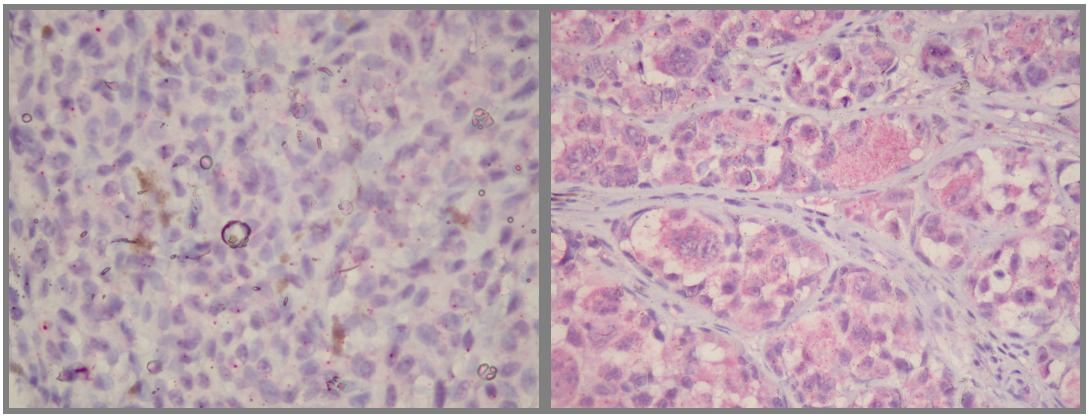

Figura 31. Imagem fotográfica das lâminas de TMA para estudo da expressão de FasL em nevo-controle (à esquerda) e em melanoma com espessura de 2,8 mm (à direita). Caso 68. (Aumento de 400x).

O estudo dos EC médios relativos a FasL (citoplasma) evidenciou exatamente os mesmos achados que o estudo dessa proteína na membrana.

Ou seja, a expressão dessa proteína (citoplasma) foi significativamente menor nos nevos-controle em comparação a todos os demais grupos de estudo. Por outro lado, a porcentagem média de expressão dessa proteína foi significativamente menor nos melanomas ≥ 1 mm em relação aos melanomas < 1 mm (Tabela 18).

Novamente, distribuição das freqüências relativas ao valor mediano do padrão não neoplásico de FasL (citoplasma) não evidenciou diferenças significativas quando comparados os grupos de melanomas pela espessura da lesão (Figura 32).

Tabela 18. Valores descritivos relativos às médias±desvios-padrão dos escores compostos de expressão da FasL (citoplasma) nos diferentes grupos de estudo.

Escores compostos	Nevos-controle	Melanomas		
		Geral	< 1mm	≥ 1mm
Menor valor	5,5	20,9	20,9	5,2
Maior valor	43,6	59,2	59,2	56,0
Média	13,5	37,6	45,4	29,1
Desvio-padrão	11,0	13,6	9,7	12,2
Mediana	10,6	39,9	48,0	28,9

	Estatística:	F*	p**
Controles	Melanomas	0,503	**0,000**
	Melanomas < 1 mm	0,554	**0,000**
	Melanomas ≥ 1 mm	0,795	**0,000**
Melanomas < 1 mm	Melanomas ≥ 1 mm	0,192	**0,000**

(*) Comparação das variâncias; (**) Comparação das médias e desvios-padrão: Teste t de Sudent

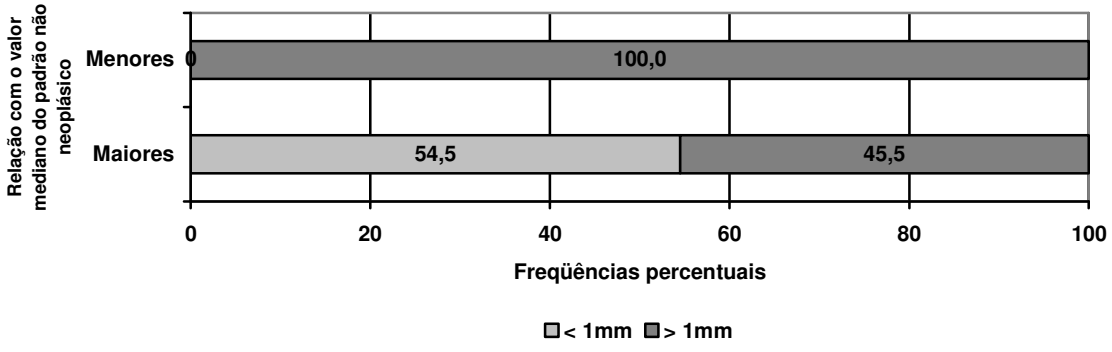

Figura 32. Representação gráfica da distribuição das freqüências relativas ao valor mediano do padrão não neoplásico da FasL (citoplasma) de acordo com a espessura dos melanomas (< ou ≥ 1mm). $\chi^2 = 1,58$; 1 grau de liberdade; p = 0,208.

5.2.10 Fas (membrana)

A Figura 33 ilustra lâminas de TMA para estudo da expressão de Fas em nevo-controle e em melanoma.

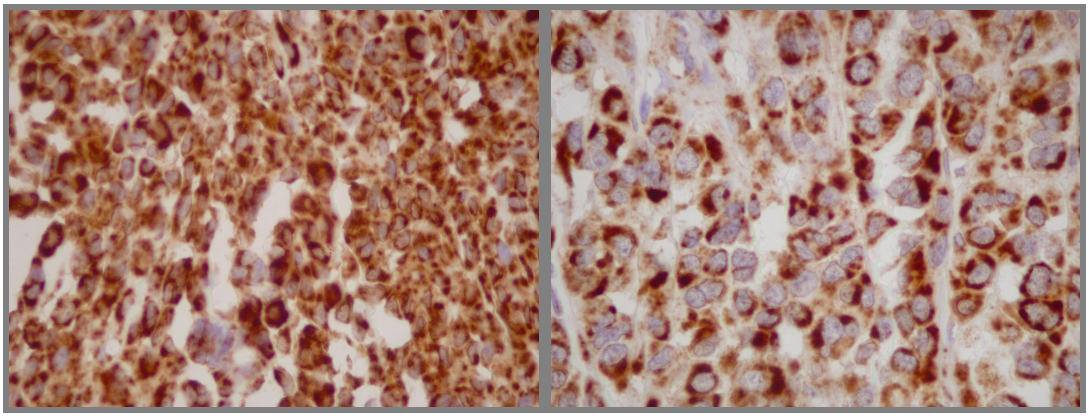

Figura 33. Imagem fotográfica das lâminas de TMA para estudo da expressão de Fas em nevo-controle (à esquerda) e em melanoma com espessura de 2,8 mm (à direita). Caso 68. (Aumento de 400x).

O estudo dos EC médios relativos a Fas (membrana) evidenciou expressão dessa proteína significativamente menor nos nevos-controle em comparação ao grupo geral de melanomas e ao grupo de melanomas $\geq$ 1mm, mas foi similar à dos melanomas < 1mm.

A expressão de Fas (membrana) foi significativamente maior nos $\geq$ 1 mm em relação aos melanomas < 1 mm (Tabela 19), diferença ratificada pela distribuição das freqüências relativas ao valor mediano do padrão não neoplásico de Fas (Figura 34).

Tabela 19. Valores descritivos relativos às médias±desvios-padrão dos escores compostos de expressão da Fas (membrana) nos diferentes grupos de estudo.

Escores compostos	Nevos-controle	Melanomas		
		Geral	≤ 1mm	≥ 1mm
Menor valor	2,9	0,0	0,1	0,0
Maior valor	14,5	35,2	32,1	35,2
Média	7,5	11,4	8,5	14,6
Desvio-padrão	3,7	8,2	6,7	8,7
Mediana	7,6	9,4	7,6	14,6

		Estatística:		
			F*	p**
Controles		Melanomas	0,012	**0,014**
		Melanomas < 1 mm	0,060	0,629
		Melanomas ≥ 1 mm	0,009	**0,000**
Melanomas < 1 mm		Melanomas ≥ 1 mm	0,128	**0,001**

(*) Comparação das variâncias; (**) Comparação das médias e desvios-padrão: Teste t de Sudent

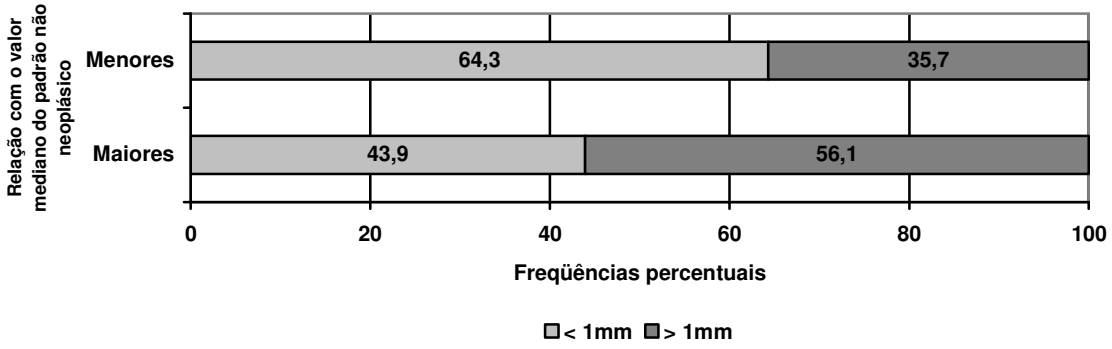

Figura 34. Representação gráfica da distribuição das freqüências relativas ao valor mediano do padrão não neoplásico da Fas (membrana) de acordo com a espessura dos melanomas (< ou ≥ 1mm). χ^2 = 3,64; 1 grau de liberdade; p = 0,050.

5.2.11 Fas (citoplasma)

Tanto o estudo dos EC médios quanto a distribuição de freqüências dos valores relativos ao padrão não neoplásico de Fas (citoplasma) não revelaram quaisquer diferenças estatísticas entre os grupos de estudo (Tabela 20; Figura 35).

Tabela 20. Valores descritivos relativos às médias±desvios-padrão dos escores compostos de expressão da Fas (citoplasma) nos diferentes grupos de estudo.

Escores compostos	Nevos-controle	Melanomas		
		Geral	≤ 1mm	≥ 1mm
Menor valor	49,2	0,2	3,8	0,2
Maior valor	149,8	140,5	132,0	140,5
Média	85,7	74,2	66,8	82,3
Desvio-padrão	33,6	35,7	31,7	38,5
Mediana	80,1	71,4	70,2	94,7

		Estatística:	
		F*	p**
Controles	Melanomas	0,912	0,342
	Melanomas < 1 mm	0,746	0,107
	Melanomas ≥ 1 mm	0,695	0,803
Melanomas < 1 mm	Melanomas ≥ 1 mm	0,261	0,071

(*) Comparação das variâncias; (**) Comparação das médias e desvios-padrão: Teste t de Sudent

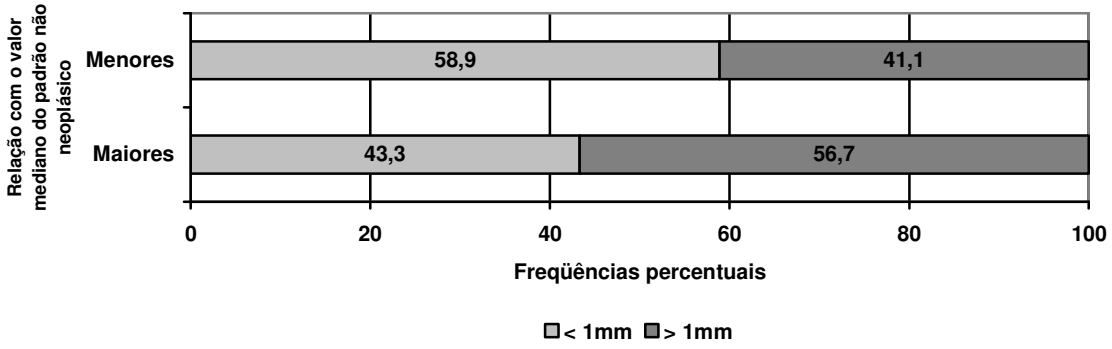

Figura 35. Representação gráfica da distribuição das freqüências relativas ao valor mediano do padrão não neoplásico da Fas (membrana) de acordo com a espessura dos melanomas (≤ ou ≥ 1mm). χ^2 = 2,34; 1 grau de liberdade; p = 0,126.

Na Tabela 21 se encontra simbolizada a síntese dos resultados encontrados nos grupos de melanomas em relação aos nevos-controle. Assim, o símbolo (=) indica que os valores médios foram semelhantes aos dos nevos-controle, e o símbolo (↑) indica valores médios significativamente maiores do que os dos nevos-controle.

Tabela 21. Síntese dos resultados estatísticos relativos aos escores compostos médios da expressão das proteínas da apoptose dos melanomas em relação aos nevos-controle.

Preteínas da apoptose	Melanomas		
	Geral	< 1mm	≥ 1mm
Bcl2 (citoplasma)	=	=	=
Bax (citoplasma)	=	=	↑
Bak (citoplasma)	↑	↑	↑
Apaf 1 (citoplasma)	↑	↑	↑
Caspase3 (citoplasma)	↑	↑	↑
Caspase9 (citoplasma)	↑	↑	↑
Caspase8 (citoplasma)	↑	↑	↑
FasL (membrana)	↑	↑	↑
FasL (citoplasma)	↑	↑	↑
Fas (membrana)	↑	=	↑
Fas (citoplasma)	=	=	=

5.3 Expressão protéica e evolução dos melanomas cutâneos primários

O estudo da evolução dos melanomas ≥ 1 mm não revelou qualquer diferença nos EC médios de todas as proteínas estudadas quando comparados os melanomas não disseminados com os disseminados (Tabela 22).

Do mesmo modo, as freqüências relativas ao padrão não neoplásico foram estatisticamente similares entre melanomas disseminados e não disseminados (Tabela 23).

Tabela 22. Comparação das médias±desvios-padrão dos escores compostos relativos à expressão das proteínas da apoptose conforme a evolução dos melanomas ≥ 1 mm.

Proteínas da	Disseminação da doença		Estatística	
Apoptose	Ausente	Presente	F	p
Bcl2 (citoplasma)	1,9±3,3	1,1±2,0	0,004	0,092
Bax (citoplasma)	43,8±20,8	47,4±33,2	0,065	0,688
Bak (citoplasma)	49,5±16,6	50,1±27,0	0,061	0,937
Apaf 1 (citoplasma)	15,8±10,5	18,4±13,7	0,285	0,556
Caspase3 (citoplasma)	17,8±11,5	18,9±13,7	0,469	0,814
Caspase9 (citoplasma)	18,3±10,5	17,4±9,7	0,825	0,802
Caspase8 (citoplasma)	49,1±24,0	46,4±32,4	0,236	0,789
FasL (membrana)	28,8±18,1	25,9±14,5	0,458	0,619
FasL (citoplasma)	29,6±12,9	28,2±11,1	0,615	0,751
Fas (membrana)	15,8±9,2	12,6±7,7	0,559	0,313
Fas (citoplasma)	82,3±41,0	78,8±35,1	0,611	0,703

Tabela 23. Distribuição das freqüências relativas ao valor mediano do padrão não neoplásico das proteínas da apoptose conforme a evolução dos melanomas ≥ 1 mm.

Proteínas da	Relação com o	Disseminação da doença				Teste
Apoptose	padrão não	Ausente		Presente		Exato de
	neoplásico	n = 21	%	n = 12	%	Fisher
Bcl2	Menores	18	85,7	10	83,3	
(citoplasma)	Maiores	3	14,3	2	16,7	p = 0,369
Bax	Menores	3	14,3	3	25,0	
(citoplasma)	Maiores	18	85,7	9	75,0	p = 0,264
Bak	Menores	1	4,8	3	25,0	
(citoplasma)	Maiores	20	95,2	9	75,0	p = 0,112
Apaf 1	Menores	3	14,3	2	16,7	
(citoplasma)	Maiores	18	85,7	10	83,3	p = 0,369
Caspase3	Menores	2	9,5	0	0	
(citoplasma)	Maiores	19	90,5	12	100,0	p = 0,397
Caspase9	Menores	3	14,3	1	8,3	p = 0,390
(citoplasma)	Maiores	18	85,7	11	91,7	
Caspase8	Menores	3	14,3	5	41,7	p = 0,075
(citoplasma)	Maiores	18	85,7	7	58,3	
FasL	Menores	2	9,5	0	0	
(membrana)	Maiores	19	90,5	12	100,0	p = 397
FasL	Menores	2	9,5	1	8,3	
(citoplasma)	Maiores	19	90,5	11	91,7	p = 0,461
Fas	Menores	6	28,6	4	33,3	
(membrana)	Maiores	15	61,4	8	66,7	p= 0,290
Fas	Menores	9	42,9	7	58,3	
(citoplasma)	Maiores	12	57,1	5	41,7	p = 0,199

6. Discussão

O melanoma cutâneo maligno ainda constitui desafio clínico importante, especialmente se considerarmos o aumento da incidência de lesões menores que vem sendo registrado nas últimas décadas em países desenvolvidos e, mais notadamente, em suas populações brancas[36,72,77]. Ainda é a principal causa de morte por câncer de pele[1].

Os métodos diagnósticos disponíveis para detecção precoce da doença, que se baseiam em achados microscópicos da morfologia tecidual, ainda carecem de acurácia[64]. Do mesmo modo, as variáveis clínicas e histológicas para determinação do prognóstico da doença incluem o Índice de Breslow, o tamanho do tumor, a presença de ulceração e o nível de invasão vascular, mas deixam lacunas na definição de grupos de risco, já que se trata de neoplasia cuja manifestação clínica é bastante variável de caso para caso[1].

O entendimento de alterações moleculares mais recentemente associadas com o melanoma cutâneo poderá esclarecer melhor a gênese de sua malignidade, o diagnóstico e o prognóstico da doença, bem como o seu tratamento[64].

No sentido de colaborar com os avanços nesse entendimento é que desenhamos e concluímos este estudo, o qual enfatizou tanto os aspectos clínicos epidemiológicos do melanoma cutâneo primário, quanto a análise da expressão de proteínas apoptóticas em amostras de tecido desse tipo de melanoma em 69 pacientes tratados pela doença entre 1990 e 2007.

Do ponto de vista epidemiológico, observamos que essa patologia afetou homens e mulheres em igual freqüência, e em idades médias semelhantes, corroborando dados da literatura internacional e nacional[2,14,36]. Relatos de diferenças entre gêneros na incidência do melanoma cutâneo parecem estar relacionados à cultura de cada país no que se refere a quem expõe qual parte do corpo ao sol com maior freqüência[58].

Neste estudo, as lesões em tronco foram mais freqüentes em homens (42,8%), enquanto lesões em membros inferiores comprometeram mais freqüentemente as mulheres (36,6%), confirmando a relação do melanoma cutâneo com radiação solar, já que sua maior incidência em áreas mais expostas ao sol determinou incidência da doença em localizações diferentes em homens e mulheres. Esses achados estão absolutamente de acordo com relatos da literatura[11,14,27]. Em nosso meio, Criado et al.[14] já haviam observado, inclusive, probabilidade 2,26 vezes maior de homens desenvolverem melanoma cutâneo em região posterior do tronco, enquanto a probabilidade de ocorrer a doença em membros inferiores é 2,4 vezes maior nas mulheres.

Não foram evidenciadas diferenças entre os gêneros quando foram avaliadas as médias de idade, os níveis de Clark, e os índices de Breslow, exceção feita às lesões com espessura de 2 mm a 4 mm, significativamente mais freqüentes no grupo masculino ($p = 0,049$).

O aumento que vem sendo relatado na ocorrência dessa neoplasia refere-se geralmente a lesões de menor espessura ou *in situ*[48,51], e 52,5% dos nossos casos se referiam a lesões < 1 mm. Também já foi demonstrado, por

outro lado, aumento no número de pacientes do sexo masculino com lesões mais espessas[19,40].

Observamos taxa de disseminação da doença seguida de óbito de 11,6%, e taxa de disseminação da doença sem óbito de 5,8%. Isso significa que 17,4% dos pacientes apresentaram disseminação da doença, sem diferenças entre homens e mulheres, e sem influência da idade dos pacientes ou da localização da lesão.

Os índices de Breslow constituíram variável preditiva da evolução da doença, já que nenhum paciente com tumores *in situ* ou com espessura < 1mm evoluiu com disseminação da doença, enquanto pacientes com tumores com espessura $\geq$ 1mm apresentaram disseminação, especialmente aqueles com tumores com espessuras > 4 mm.

Disseminação da doença foi observada, em média, 26,7 meses após o diagnóstico da lesão; os óbitos ocorreram, em média, 24,5 meses após o diagnóstico inicial. Não encontramos correlação entre esses tempos médios e as espessuras das lesões, o que sugere o risco de disseminação com ou sem óbito de lesões com espessura $\geq$ 1 mm associadas a outras características, especialmente com a presença de ulceração, já que dos casos de melanomas $\geq$ 1mm utilizados para análise de tempo livre da doença e sobrevida, 12 apresentavam ulceração da lesão, dos quais nove (75%) apresentaram disseminação da doença.

Da mesma forma, o número de mitoses detectado no tumor primário pode acompanhar a progressão da doença (r = 0,43), podendo constituir, junto com ulceração e nível de Clark, o grupo de fatores associados ao índi-

ce de Breslow que melhor podem predizer a evolução do paciente.

Por fim, nossos dados revelaram taxa de tempo livre da doença de 63% e taxa de sobrevida de 70% em cinco anos. Em nosso meio, Criado et al.[14] relataram taxa de sobrevida em cinco anos de 67,4%, valor bastante próximo do encontrado na Grã-Bretanha por Carmichael et al.[11].

Deste modo, nossas observações clínicas e epidemiológicas foram bastante compatíveis com relatos da literatura sobre melanoma cutâneo primário, assegurando, assim, a fidedignidade de nossos achados relativos à expressão das proteínas da apoptose no grupo estudado.

Para a quantificação da expressão das proteínas da apoptose em melanoma primário, utilizamos a técnica de TMA nos pacientes com melanoma $\geq$ 1mm. Essa técnica, segundo revisão realizada por Alonso et al.[1], constitui técnica ideal para o estudo da progressão de melanomas malignos que, além de contribuir para a identificação de eventos moleculares-chave, também facilita o desenvolvimento de modelos preditores acurados.

No entanto, a comparação de dados entre os estudos publicados é quase impossível, considerando-se a forma de observação da variabilidade de expressão de proteínas relacionadas à apoptose. Em sua maioria, os estudos são semiquantitativos e não puramente quantitativos.

Daí et al.[15] construíram TMA para estudo da expressão de Apaf-1 em melanomas, e as lâminas marcadas foram lidas por três observadores independentes para determinação de escores consensuais, a partir dos quais a intensidade da coloração foi classificada em sistema de cruzes, a saber: negativa (0); fraca (+), moderada (++) e forte (+++). No trabalho de Espíndo-

la e Corleta[22] que estudaram a expressão de Bcl-2 em melanomas metastáticos, dois patologistas avaliaram as lâminas e as classificaram de acordo com a intensidade de coloração em: negativa (menos de 5% de células marcadas); positividade fraca (5% a 50%); positividade forte (mais que 50% de células marcadas).

Alonso et al.[1] estudaram a expressão de diferentes proteínas em melanomas com crescimento radial, vertical e nos metastáticos. A intensidade de coloração das lâminas foi também avaliada por dois patologistas que atribuíram escores à expressão dessas proteínas de acordo com critério de corte uniforme e claro (mas que não é especificado na respectiva publicação), do qual resultou fenótipo positivo para cada proteína estudada.

Hes et al.[35] e Kanehira et al.[41] utilizaram equipamento ACIS compatível ao que usamos neste estudo para a leitura da expressão das proteínas. Hes et al. basearam seus achados nos valores de intensidade média fornecidos pelo programa específico do aparelho. Kanehira et al. propuseram o uso de escores compostos, calculados pelo valor de intensidade multiplicado pelo valor de porcentagem de tecido marcado dividido por cem, e determinaram a positividade da amostra pela seguinte fórmula: Escore composto = 25% da intensidade máxima x 15% (área marcada) = 10.

Ressalte-se, porém, que nenhum desses estudos avaliaram amostras de pele sadia ou de nevos pigmentados como controles.

Deste modo, adotamos a proposta de Kanehira et al.[41] para determinação dos valores de expressão. Para a determinação de um valor de corte para as comparações entre os subgrupos de estudo que nos interessaram

(nevos-controle, grupo geral de melanomas, melanomas < ou ≥ 1mm e melanomas disseminados ou não disseminados), adotamos o valor mediano de expressão de cada proteína no grupo de nevos-controle, considerando-o valor normal de expressão das proteínas apoptóticas em células não neoplásicas.

O estudo evidenciou, assim, que a expressão das proteínas de característica pró-apoptótica foi, no geral, significativamente menor nos nevos-controle em comparação aos melanomas menores e maiores que 1 mm, exceto pela expressão de BAX, cuja expressão foi significativamente maior em melanomas ≥ 1 mm que em nevos-controle.

Na maioria das proteínas estudadas (BAK, Apaf1, Caspase 9, caspase 3, Caspase 8 e FasL) a distribuição das freqüências relativas ao valor mediano do padrão não neoplásico da expressão protéica não evidenciou diferenças significativas quando comparados os grupos de melanoma pela espessura da lesão. No estudo de BAX houve diferença significativa somente para o grupo relativo a melanomas ≥ 1 mm, cuja expressão dessa proteína foi maior também que a do grupo de melanomas < 1mm.

Não observamos qualquer diferença na expressão das proteínas da apoptose na comparação entre melanomas ≥ 1mm que disseminaram e os que não disseminaram.

Os resultados de diferentes estudos em relação ao papel da Bcl-2 em melanomas cutâneos têm sido bastante controversos, já que alguns autores descrevem aumento de bcl-2 na progressão de melanócitos normais em melanomas[30,70], enquanto outros observaram justamente o contrário[44,53].

Neste estudo, a expressão de Bcl-2 foi semelhante nos nevos-controle e nos melanomas mais finos, mas foi significativamente mais fraca nos melanomas primários $\geq$ 1 mm, ou seja, nossos achados ratificam os resultados de estudos que observaram decréscimo da expressão de Bcl2 na progressão dos melanomas. Já foi sugerido que sub-expressão de Bcl-2 estaria relacionada com o crescimento autônomo que é característico do melanoma maligno[73].

Recentemente, Espíndola e Corleta[22] relataram que a expressão imuno-histoquímica de Bcl-2, considerada isoladamente, não constitui marcador prognóstico para melanomas cutâneos.

A resposta encontrada na maioria das proteínas estudadas foi de maior expressão da apoptose nas amostras de melanoma. O mesmo se aplica à baixa expressão de Bcl2, proteína de atividade anti-apoptótica. Supondo-se que os mecanismos de controle das células estejam funcionantes, é licito propor que células com alto índice de mutações acionem a maquinaria de apoptose. Por outro lado, células com alto índice proliferativo poderiam acionar mais freqüentemente a morte celular programada. Ainda, considerando que nossos dados possam ser reproduzidos por outros experimentos, é possível que, para continuar sua expansão e disseminação, os melanomas devam lançar mão de outros mecanismos que se sobreponham à morte celular, como a proliferação, digestão da matriz extracelular, motilidade e outros.

A única resposta que poderia sugerir interferência da apoptose no crescimento tumoral seria de Fas, com expressão menor em melanomas < 1

mm na membrana celular, mas sem diferenças estatísticas entre os grupos de estudo quanto à distribuição de freqüências de reatividade no citoplasma.

Portanto, não encontramos alterações na expressão das proteínas da apoptose estudadas que pudessem sugerir o seu envolvimento tanto na gênese quanto na progressão de melanoma primário neste grupo de pacientes.

A utilização de método quantitativo claramente delineado abre a possibilidade de comparação mais fidedigna entre dados experimentais, sobretudo quando se considera que a análise semiquantitativa está sujeita a variações de interpretação intra e inter-observador. Além disto, deve-se levar em conta que investigações que não utilizam técnicas de alto rendimento, como o TMA, também exibem alta variabilidade na padronização dos métodos de coloração, pois são feitos um a um, ao contrário da primeira, em que uma única reação permite uniformizar a reação entre amostras.

Desta forma, após todas estas considerações, apresentamos a seguir as conclusões do presente estudo.

7. Conclusões

- Nosso estudo mostrou maior incidência de melanoma em áreas expostas ao sol, sendo mais freqüentes as lesões de tronco em homens, enquanto lesões em membros inferiores predominaram em mulheres.

- A evolução dos pacientes foi mais desfavorável quanto maior a espessura do tumor, correlacionada assim ao índice de Breslow.

- Os melanomas sugeriram ter perfil pró-apoptótico, o que pode significar que tanto fatores indutores da proliferação celular quanto de invasão tiveram preponderância sobre apoptose.

- Não se evidenciou alteração da expressão das proteínas anti-apoptóticas na análise comparativa dos melanomas com o grupo-controle.

- O perfil imuno-histoquímico das proteínas de apoptose não teve significado prognóstico, uma vez que não houve diferenças de expressão entre pacientes com e sem doença disseminada.

- Não encontramos alteração da expressão das proteínas da apoptose estudadas, sugestiva do seu envolvimento tanto na gênese quanto na progressão da doença, no melanoma primário neste grupo de pacientes.

8. Anexos

Anexo 1

Aprovação dos Comitês de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Hospital A. C. Camargo e Hospital Brigadeiro

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA FACULDADE DE MEDICINA
DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 16.02.05, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **1002/04**, intitulado: **"Marcadores Moleculares em Melanoma Maligno: Avaliação de Prognóstico"** apresentado pelo Departamento de **CIRURGIA**.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador(a) Responsável: **Prof. Dr. Henri Friedhofer**
Pesquisador(a) Executante: **Dr. Moris Anger**

CAPPesq, 16 de Fevereiro de 2005.

Ciente

PROF. DR. MARCUS CASTRO FERREIRA
Professor Titular da Disciplina
de Cirurgia Plástica - FMUSP

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
Presidente da Comissão de Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP
Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Rua Ovídio Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo - SP
Fone: 011 - 30696442 fax : 011 - 3069 6492 - e-mail : coppesq@hcnet.usp.br / secretariacappesq@hcnet.usp.br

Doutorando : Moris Anger

Alteração do título da tese para : **Expressão de Proteínas da Apoptose em Melanoma Cutâneo**

Anexos:

- Justificativa desta alteração
- Projeto com a nova metodologia de pesquisa
- Folha de rosto para pesquisa apresentada para realização da pesquisa no laboratório do Hospital A C Camargo (Instituição vinculada : Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP)
- Aprovação do projeto pelo CEP do Hospital A C Camargo
- Aprovação do projeto para financiamento pela Fapesp

Hospital A.C.Camargo

Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

São Paulo, 15 de Outubro de 2007.

Ao
Dr. Gilles Landman

Ref.: Projeto de Pesquisa nº 972/07
"Expressão de proteínas da apoptose em melanoma cutâneo"

Prezado Doutor:

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Fundação Antonio Prudente - Hospital A.C. Camargo, em sua última reunião de 11/09/2007, **aprovaram** a realização do estudo em referência e tomaram conhecimento dos seguintes documentos:

- Folha de Rosto para Pesquisa envolvendo Seres Humanos;
- Termo de dispensa do consentimento livre e esclarecido;
- Termo de compromisso do pesquisador com Resoluções do Conselho Nacional de Saúde;
- Orçamento Financeiro detalhado;
- Declaração de ciência e comprometimento do Departamento de Anatomia Patológica;
- Declaração de Ciência do Departamento de Oncologia Cutânea;
- Carta de aprovação do projeto na CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina de São Paulo;
- Carta de aprovação do projeto no CEP do Hospital Brigadeiro.

Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhadas à assistente do CEP dentro de 12 meses.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Luiz Paulo Kowalski
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

Rua Prof. Antônio Prudente, 211 – Liberdade – São Paulo – SP CEP 01509-900 - CNPJ 60.961.968/0001-06
Tel/Fax (0XX11)2189.5020 – cep_hcancer@hcancer.org.br

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DE SERVIÇO DE SAÚDE
UGA - V - HOSPITAL BRIGADEIRO
COMITE DE ÉTICA EM PESQUISA
Av. Brigadeiro Luiz Antônio, 2621 Tel.3253-9704 / 3284-9111 r. 2186 / FAX 3289-2421
cephb@terra.com.br

São Paulo, 05 de setembro de 2007.

Carta de Aprovação

Registro CEP-HB: 015/07-P

Título do Protocolo: "Marcadores Moleculares em Melanoma Maligno: Avaliação de Prognóstico".

Prezado Dr. Moris Anger

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Brigadeiro, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, em 05 de setembro de 2007, sob o ponto de vista ético aprovou o Protocolo acima proposto.

Confirmamos que a aprovação ocorreu por unanimidade e que nenhum dos pesquisadores envolvidos no estudo participou da votação.

Queremos recorda-lhe do compromisso de nos enviar relatórios semestrais da evolução do estudo, conforme determinação da CONEP.

Anexo:
Protocolo de Pesquisa Clínica;
Folha de Rosto;
Parecer Consubstanciado.

Dra. Leila de Lourdes Martins Perobelli
Coordenadora do CEP-HB

Anexo 2

Dados clínicos e epidemiológicos

Caso	Iniciais do nome	Sexo	Idade	Localização da lesão	Data da cirurgia	Índices de Breslow	Níveis de Clark
1	**ARA**	**M**	**25**	**Membro inferior**	**24/04/90**	**3,0**	**III**
2	WGJB	M	48	Tronco	06/05/93	0,5	II
3	DRR	F	63	Membro inferior	01/02/94	1,1	III
4	VVP	F	37	Membro inferior	27/10/94	0,5	III
5	MCMPA	F	39	Tronco	13/12/94	0,7	III
6	AS	M	70	Cabeça e Pescoço	25/04/95	in situ	I
7	PSSJ	M	20	Tronco	18/08/95	0,8	III
8	MFL	F	80	Membro superior	31/08/95	0,9	III
9	RAZ	M	44	Tronco	12/12/95	1,1	III
10	**SC**	**F**	**21**	**Membro inferior**	**02/04/96**	**9,0**	**V**
11	EHF	M	52	Tronco	17/05/96	0,3	III
12	**AG**	**M**	**72**	**Cabeça e Pescoço**	**04/07/96**	**4,2**	**IV**
13	ACM	F	23	Membro inferior	18/07/96	1,3	III
14	CSVP	F	74	Cabeça e Pescoço	17/06/97	in situ	I
15	AG	M	67	Cabeça e Pescoço	17/04/98	2,1	III
16	GZ	M	67	Tronco	08/04/98	0,8	III
17	**VRA**	**M**	**65**	**Tronco**	**04/08/98**	**7,0**	**IV**
18	**JSJ**	**F**	**64**	**Membro inferior**	**06/11/98**	**1,3**	**IV**
19	SMC	F	49	Tronco	27/04/99	0,2	II
20	SAG	F	37	Tronco	08/06/99	0,4	II
21	ZGA	F	65	Membro inferior	22/06/99	1,6	IV
22	SGD	F	49	Membro superior	09/11/99	0,5	III
23	MCWM	F	49	Tronco	07/12/99	0,6	III
24	MDH	F	73	Cabeça e Pescoço	27/01/00	in situ	I
25	SA	F	38	Tronco	16/02/00	0,7	III
26	IRC	F	48	Cabeça e Pescoço	11/07/00	9,0	V
27	SC	M	45	Membro inferior	19/09/00	1,8	III
28	RC	F	84	Cabeça e Pescoço	20/03/01	1,7	IV
29	NLM	F	81	Membro superior	16/04/01	0,4	III
30	TC	M	69	Tronco	27/07/01	0,3	II
31	SRF	F	41	Tronco	13/08/01	0,3	II
32	EL	F	61	Membro superior	21/01/02	in situ	I
33	RDN	M	57	Tronco	31/01/02	1,1	III
34	RAK	F	49	Membro inferior	13/05/02	0,3	III
35	MS	M	53	Membro inferior	17/08/02	2,7	III
36	ASH	M	52	Tronco	20/09/02	0,3	II
37	**JMLS**	**F**	**72**	**Membro inferior**	**01/11/02**	**1,1**	**III**
38	EB	M	85	Cabeça e Pescoço	01/04/03	0,6	II
39	MFPS	F	29	Membro inferior	10/04/03	0,35	III
40	HPF	F	67	Membro superior	03/10/03	0,5	III
41	AKJ	M	37	Tronco	14/10/03	0,5	III
42	TSA	F	50	Membro inferior	03/05/04	0,3	II
43	**ITV**	**F**	**91**	**Membro superior**	**24/06/04**	**7,0**	**III**
44	**ISF**	**F**	**74**	**Cabeça e Pescoço**	**17/05/04**	**5,0**	**V**
45	VSA	M	72	Cabeça e Pescoço	02/07/04	in situ	I
46	NBG	F	58	Membro inferior	23/08/04	1,5	IV

Caso	Iniciais do nome	Sexo	Idade	Localização da lesão	Data da cirurgia	Índices de Breslow	Níveis de Clark
47	LBA	F	77	Cabeça e Pescoço	02/12/04	0,3	II
48	RAL	F	39	Membro superior	20/01/05	0,4	II
49	MNC	F	70	Cabeça e Pescoço	22/02/05	7,0	V
50	**CGA**	**M**	**39**	**Membro inferior**	**11/04/05**	**2,5**	**IV**
51	SRPR	F	47	Membro superior	14/04/05	0,7	III
52	**AS**	**M**	**69**	**Cabeça e Pescoço**	**16/06/05**	**3,5**	**IV**
53	ESM	M	71	Membro superior	30/06/05	0,7	III
54	JB	M	68	Membro superior	11/08/05	2,4	III
55	**SSS**	**M**	**64**	**Cabeça e Pescoço**	**20/09/05**	**3,4**	**IV**
56	**JVS**	**F**	**72**	**Tronco**	**21/10/05**	**9,2**	**IV**
57	EAN	M	52	Tronco	01/12/05	0,3	II
58	BWS	F	78	Membro inferior	22/03/06	1,2	III
59	OC	M	67	Membro superior	25/08/06	3,4	III
60	CS	F	36	Membro superior	21/09/06	0,5	III
61	MCBMV	F	69	Membro superior	13/12/06	3,9	V
62	SF	M	88	Cabeça e Pescoço	23/02/07	3,4	IV
63	NAR	M	52	Tronco	08/03/07	1,4	III
64	CB	F	62	Membro inferior	08/05/07	1,8	III
65	MLD	F	53	Membro inferior	25/05/07	in situ	I
66	JFC	M	65	Membro superior	24/05/07	2,8	III
67	ACF	F	81	Cabeça e Pescoço	28/05/07	0,9	III
68	LMAF	F	55	Membro inferior	18/10/07	2,8	III
69	CMZ	F	66	Membro superior	24/10/07	0,1	II

Anexo 3

Dados histológicos

Casos	Tipo histológico	Crescimento	Ulceração	Mitose
1	**Extensivo superficial**	**Vertical**	**---**	**9**
2	Extensivo superficial	Vertical	---	0
3	Extensivo superficial	Vertical	---	0
4	Extensivo superficial	Vertical	---	1
5	Extensivo superficial	Vertical	---	zero
6	NC	NC	NC	NC
7	Extensivo superficial	Vertical	---	1
8	Extensivo superficial	Vertical	---	2
9	Extensivo superficial	Vertical	---	8
10	**Nodular**	**Vertical**	**+**	**18**
11	Extensivo superficial	Vertical	---	zero
12	**Extensivo superficial**	**Vertical**	**+**	**15**
13	Extensivo superficial	Vertical	+	2
14	NC	NC	NC	NC
15	Nodular	Vertical	---	7
16	Extensivo superficial	Vertical	---	1
17	**Extensivo superficial**	**Vertical**	**+**	**21**
18	**Extensivo superficial**	**Vertical**	**+**	**9**
19	Extensivo superficial	Vertical	---	zero
20	Extensivo superficial	Vertical	---	1
21	Extensivo superficial	Vertical	---	4
22	Extensivo superficial	Vertical	---	zero
23	Extensivo superficial	Vertical	---	zero
24	Lentigo maligno	NC	NC	NC
25	Extensivo superficial	Vertical	---	1
26	Nodular	NC	+	3
27	Extensivo superficial	Vertical	---	4
28	Extensivo superficial	Vertical	---	2
29	Extensivo superficial	Vertical	---	zero
30	Extensivo superficial	Radial	---	zero
31	Extensivo superficial	Vertical	---	zero
32	NC	NC	NC	NC
33	Extensivo superficial	Vertical	---	zero
34	Extensivo superficial	Vertical	---	zero
35	Nodular	Vertical	---	3
36	Extensivo superficial	Radial	---	zero
37	**Acral lentiginoso**	**NC**	**---**	**zero**
38	Extensivo superficial	Vertical	---	2
39	Acral lentiginoso	Vertical	---	1
40	Extensivo superficial	Vertical	---	zero
41	Extensivo superficial	Vertical	---	zero
42	Extensivo superficial	Radial	---	zero
43	**Nodular**	**Vertical**	**+**	**33**
44	**Nodular**	**Vertical**	**+**	**3**
45	NC	NC	NC	NC
46	Extensivo superficial	Vertical	---	3
47	Lentigo maligno	Vertical	---	zero

Casos	Tipo histológico	Crescimento	Ulceração	Mitose
48	Extensivo superficial	Radial	NC	zero
49	Lentigo maligno	Vertical	---	3
50	**Extensivo superficial**	**Vertical**	**---**	**3**
51	Extensivo superficial	Vertical	---	1
52	**Nodular**	**Vertical**	**+**	**1**
53	Extensivo superficial	Vertical	---	---
54	Extensivo superficial	Vertical	---	6
55	**Extensivo superficial**	**Vertical**	**+**	**1**
56	**Extensivo superficial**	**Vertical**	**+**	**3**
57	Extensivo superficial	Radial	---	zero
58	Extensivo superficial	Vertical	---	zero
59	Extensivo superficial	Vertical	+	13
60	Extensivo superficial	Vertical	---	zero
61	Extensivo superficial	Vertical	---	3
62	Nodular	Vertical	+	1
63	Extensivo superficial	Vertical	---	3
64	Extensivo superficial	Vertical	+	2
65	NC	NC	NC	NC
66	Acral lentiginoso	Vertical	+	10
67	Lentigo maligno	Vertical	---	1
68	Extensivo superficial	Vertical	+	14
69	Extensivo superficial	Radial	---	zero

Anexo 4

Dados da evolução da doença

Casos	Seguimento (meses)	Disseminação	Óbito
1	**28**	**10/1991**	**08/1992**
2	74	N	N
3	65	N	N
4	62	N	N
5	60	N	N
6	40	N	N
7	61	N	N
8	50	N	N
9	155	N	N
10	**12**	**08/1996**	**1997**
11	112	N	N
12	**132**	**12/2006**	**N**
13	40	N	N
14	13	N	N
15	114	N	N
16	58	N	N
17	**15**	**09/1999**	**11/1999**
18	**67**	**04/2004**	**06/2004**
19	12	N	N
20	11	N	N
21	96	N	N
22	36	N	N
23	48	N	N
24	85	N	N
25	88	N	N
26	98	N	N
27	86	N	N
28	87	N	N
29	89	N	N
30	71	N	N
31	9	N	N
32	48	N	N
33	79	N	N
34	76	N	N
35	72	N	N
36	72	N	N
37	**5**	**04/2003**	**04/2003**
38	54	N	N
39	63	N	N
40	55	N	N
41	59	N	N
42	45	N	N
43	**43**	**08/2005**	**01/2008**
44	**6**	**10/2004**	**11/2004**
45	48	N	N
46	43	N	N
47	45	N	N

Casos	Seguimento (meses)	Disseminação	Óbito
48	41	N	N
49	41	N	N
50	**4**	**08/2005**	**N**
51	38	N	N
52	**10**	**03/2006**	**04/2006**
53	38	N	N
54	37	N	N
55	**36**	**10/2007**	**N**
56	**35**	**08/2008**	**09/2008**
57	33	N	N
58	24	N	N
59	25	N	N
60	21	N	N
61	19	N	N
62	17	N	N
63	15	N	N
64	13	N	N
65	15	N	N
66	16	N	N
67	9	N	N
68	10	N	N
69	9	N	N

Anexo 5

Dados da leitura da expressão de Bcl2

Caso	Escore	Porcentagem	Intensidade	Área marrom	Área azul	Escores compostos (EC)
1	**0,5**	**1,2**	**60,2**	**69,6**	**4.878,3**	**0,7**
2	0,4	1,7	48,4	29,2	1.516,2	0,8
3	1,4	0,2	57,7	6,3	2.886,9	0,1
4	0,4	9,5	55,0	509,0	5.411,6	5,2
5	0,5	0,2	57,5	18,5	7.546,0	0,1
6	0,5	0,3	58,8	18,6	5.902,2	0,2
7	0,4	8,4	56,8	337,4	3.625,8	4,8
8	0,5	1,1	59,6	42,2	3.757,0	0,7
9	0,5	0,2	60,4	7,6	4.190,6	0,1
10	**0,4**	**0,1**	**52,6**	**6,5**	**5.080,3**	**0,1**
11	0,5	19,0	60,2	805,0	3.369,2	11,4
12	**0,4**	**8,1**	**56,2**	**464,1**	**4.712,1**	**4,6**
13	0,4	0,8	56,0	28,5	3.893,9	0,4
14	0,4	0,1	54,2	3,6	3.267,0	0,1
15	0,4	0,5	53,5	26,7	4.637,5	0,3
16	0,4	8,6	50,2	311,4	3.305,4	4,3
17	**0,4**	**0,2**	**55,8**	**10,3**	**5.602,2**	**0,1**
18	**0,4**	**0,1**	**54,8**	**4,7**	**5.244,9**	**0,1**
19	0,5	16,6	60,6	426,6	2.118,8	10,1
20	0,4	15,4	57,0	493,6	2.730,6	8,8
21	0,5	0,8	59,5	39,4	4.719,9	0,5
22	0,4	12,7	49,6	114,6	808,6	6,3
23	0,4	31,6	56,4	1.523,0	3.235,0	17,8
24	0,5	2,5	58,0	125,2	4.836,6	1,5
25	0,6	8,5	61,0	403,6	4.253,6	5,2
26	0,5	0,3	58,8	19,3	7.074,9	0,2
27	0,5	0,2	59,2	6,0	3.226,0	0,1
28	0,5	0,4	57,5	22,3	5.838,1	0,2
29	0,5	14,6	58,8	112,8	707,0	8,6
30	0,5	0,8	59,4	49,8	6.271,2	0,5
31						
32						
33	0,4	1,7	55,9	63,3	3.625,1	0,9
34	0,4	0,3	53,6	8,8	3.542,0	0,1
35	0,4	3,6	54,7	175,4	4.442,1	2,0
36	1,5	79,3	78,4	2.956,6	752,6	62,2
37	**0,5**	**10,3**	**57,2**	**385,7**	**3.498,6**	**5,9**
38	0,8	12,7	66,4	976,6	6.713,2	8,4
39	1,3	38,5	76,2	575,4	898,8	29,3
40	0,5	2,5	59,2	87,2	3.479,0	1,5
41	0,5	0,7	61,8	29,4	4.180,6	0,4
42	0,5	3,3	61,4	109,2	3.488,4	2,0
43	**0,4**	**1,1**	**51,3**	**41,7**	**3.693,6**	**0,6**
44	**0,5**	**0,4**	**59,2**	**20,9**	**6.434,0**	**0,2**
45	0,9	22,3	69,8	696,6	2.406,4	15,6
46	0,4	0,9	51,5	38,4	3.890,6	0,5

Caso	Escore	Porcentagem	Intensidade	Área marrom	Área azul	Escores compostos (EC)
47	0,4	14,4	56,8	543,6	3.236,4	8,2
48	1,0	60,6	71,0	2.933,4	1.895,2	43,0
49	0,4	1,3	56,3	68,4	4.524,9	0,7
50	**0,7**	**0,0**	**64,9**	**0,9**	**2.643,0**	**0,0**
51	0,4	13,7	52,4	219,0	1.399,0	7,2
52	**0,5**	**0,3**	**58,2**	**12,3**	**4.202,3**	**0,2**
53	0,5	54,5	59,6	1.455,2	1.333,0	32,5
54	0,4	22,3	54,2	961,3	3.349,5	12,1
55	**1,1**	**0,4**	**71,8**	**5,8**	**1.916,6**	**0,3**
56	**1,0**	**0,4**	**70,9**	**7,5**	**1.744,7**	**0,3**
57	0,4	2,2	56,6	114,4	5.042,8	1,3
58	0,5	2,1	58,0	71,4	3.466,6	1,2
59	0,4	1,5	52,5	69,5	4.260,0	0,8
60	0,4	0,4	55,6	11,0	2.863,6	0,2
61	0,4	0,4	53,0	12,8	3.866,3	0,2
62	0,5	0,6	62,0	26,9	4.088,5	0,4
63	0,4	13,1	56,0	189,2	1.293,4	7,3
64	0,4	4,2	53,5	197,5	4.367,8	2,2
65	0,5	0,5	57,8	18,1	3.764,4	0,3
66	0,5	0,6	58,2	13,0	2.248,6	0,4
67	0,6	1,1	61,0	31,0	2.927,0	0,7
68	0,4	15,8	54,8	892,7	4.816,5	8,6
69	0,4	0,3	57,2	12,2	4.905,8	0,2
Nevos-controle						
	0,4	**1,8**	**54,5**	**72,5**	**3.956,6**	**1,0**
	0,4	**3,2**	**56,7**	**164,8**	**4.970,8**	**1,8**
	0,4	**13,7**	**55,0**	**613,2**	**3.744,5**	**7,5**
	0,5	**21,0**	**57,9**	**1.362,7**	**4.758,0**	**12,1**
	0,4	**1,0**	**55,2**	**45,3**	**4.323,1**	**0,6**
	0,4	**1,0**	**51,3**	**24,3**	**3.220,9**	**0,5**
	0,5	**4,7**	**56,5**	**228,2**	**4.693,2**	**2,6**
	0,4	**13,8**	**54,4**	**655,9**	**4.041,3**	**7,5**
	0,5	**7,4**	**57,6**	**361,7**	**4.450,8**	**4,3**
	0,4	**0,2**	**47,6**	**8,4**	**3.729,2**	**0,1**

Anexo 6

Dados da leitura da expressão de BAX

Caso	Escore	Porcentagem	Intensidade	Área marrom	Área azul	Escores compostos (EC)
1	**1,7**	**78,8**	**84,0**	**5.360,4**	**1.240,1**	**66,2**
2	0,8	69,4	66,8	2.599,0	1.102,8	46,4
3	1,2	1,0	74,8	23,1	2.447,3	0,7
4	0,5	99,5	61,8	8.742,8	42,6	61,5
5						0,0
6	1,1	3,1	73,4	102,6	3.318,0	2,3
7	1,0	82,5	70,2	4.894,6	979,0	57,9
8	1,2	73,6	73,8	3.317,0	1.155,2	54,3
9	1,7	64,7	86,7	3.364,3	1.336,3	56,1
10	**2,2**	**95,8**	**100,7**	**6.919,9**	**308,8**	**96,5**
11	0,6	19,2	63,4	515,4	2.377,4	12,1
12	**1,9**	**83,0**	**90,3**	**6.103,3**	**939,3**	**74,9**
13	1,3	70,3	76,6	4.328,0	1.625,1	53,9
14	0,5	0,1	60,5	3,5	3.010,0	0,1
15	1,6	76,1	82,4	5.710,0	1.496,9	62,7
16	0,6	20,8	64,0	755,4	2.916,0	13,3
17	**1,1**	**49,9**	**72,7**	**3.056,6**	**2.836,1**	**36,2**
18	**1,6**	**52,9**	**81,9**	**2.813,8**	**2.498,4**	**43,3**
19	1,0	35,1	70,0	941,4	1.800,2	24,6
20	1,6	92,9	82,8	6.147,2	468,8	76,9
21	1,6	78,4	82,6	5.138,4	1.277,6	64,7
22	1,1	59,0	72,2	2.878,0	1.988,8	42,6
23	0,7	58,0	65,2	3.513,6	2.157,0	37,8
24	0,7	3,8	65,2	135,6	3.498,0	2,5
25	1,1	81,5	73,0	4.559,2	1.025,2	59,5
26	1,2	39,5	74,8	2.366,9	3.529,3	29,5
27	1,0	65,8	70,0	2.121,8	949,8	46,1
28	1,5	34,6	81,3	2.279,8	4.353,0	28,1
29	1,2	5,8	73,6	128,2	2.272,2	4,3
30	0,7	2,4	65,2	138,8	5.859,8	1,6
31	0,4	0,1	56,0	1,8	3.528,4	0,0
32	0,5	0,5	59,2	11,8	2.399,0	0,3
33	1,3	32,5	75,9	1.578,6	2.757,0	24,7
34	0,5	99,8	62,6	9.541,0	20,6	62,5
35	1,6	78,0	81,4	5.674,0	1.429,5	63,4
36	1,6	78,7	82,8	5.544,0	1.415,8	65,2
37	**1,3**	**63,1**	**75,0**	**3.138,1**	**1.717,5**	**47,3**
38	1,2	85,9	74,2	5.702,2	932,6	63,7
39	1,5	60,6	79,0	1.806,4	1.151,4	47,9
40	1,4	84,2	77,2	5.330,2	972,4	65,0
41	1,2	64,8	74,8	2.425,6	1.213,6	48,5
42	1,0	29,5	71,2	989,6	2.352,4	21,0
43	**1,3**	**51,2**	**78,1**	**4.163,4**	**1.487,1**	**40,0**
44	**0,9**	**0,6**	**69,0**	**33,3**	**6.861,5**	**0,4**
45	1,5	48,7	78,4	1.703,2	1.766,2	38,2
46	0,8	42,5	67,6	2.469,8	2.471,9	28,7

Caso	Escore	Porcentagem	Intensidade	Área marrom	Área azul	Escores compostos (EC)
47	0,6	2,2	64,6	72,8	3.609,8	1,4
48	1,0	29,1	70,4	1.596,0	3.844,8	20,5
49	1,5	70,1	81,4	5.728,6	1.867,4	57,0
50	**2,2**	**50,3**	**98,9**	**1.008,4**	**988,0**	**49,7**
51	1,4	87,7	78,2	6.074,6	824,2	68,6
52	**1,0**	**22,0**	**70,3**	**975,5**	**3.290,8**	**15,4**
53	0,7	48,4	65,8	1.560,8	1.664,8	31,9
54	1,5	86,9	79,6	6.434,8	878,5	69,1
55						**0,0**
56	**2,8**	**85,9**	**118,5**	**2.756,5**	**288,9**	**101,8**
57	0,6	17,5	63,4	655,6	2.907,6	11,1
58	1,4	61,2	78,3	3.111,0	1.617,3	47,9
59	0,9	46,8	69,1	2.498,2	2.549,0	32,3
60	0,8	59,9	67,8	2.700,2	1.710,2	40,6
61	0,7	14,9	66,6	582,7	3.229,4	9,9
62	1,5	40,8	79,9	1.387,7	2.036,2	32,6
63	1,0	55,9	70,0	2.763,0	2.189,2	39,1
64	0,9	61,7	69,7	3.752,5	2.055,1	43,0
65	1,6	73,4	84,7	4.709,7	1.437,2	62,1
66	1,1	58,2	72,2	3.204,4	2.243,2	42,0
67	1,5	61,5	79,8	2.850,4	1.695,4	49,1
68	2,0	96,0	92,8	8.414,8	334,3	89,1
69	0,7	4,6	66,6	138,0	2.836,8	3,1
Nevos-controle						
	0,7	**7,8**	**65,9**	**282,4**	**4.309,7**	**5,1**
	0,9	**13,6**	**69,3**	**646,6**	**4.060,3**	**9,4**
	0,9	**44,6**	**68,9**	**2.067,2**	**2.263,4**	**30,7**
	1,2	**71,0**	**73,6**	**4.470,9**	**1.596,0**	**52,2**
	0,8	**9,8**	**67,5**	**422,2**	**4.027,1**	**6,6**
	0,9	**3,9**	**69,9**	**110,9**	**3.299,4**	**2,7**
	1,5	**61,5**	**80,4**	**3.221,8**	**1.993,1**	**49,5**
	0,9	**32,0**	**68,8**	**1.693,1**	**3.452,5**	**22,0**
	1,2	**44,0**	**73,5**	**2.078,5**	**2.621,0**	**32,3**
	0,6	**49,7**	**64,6**	**2.113,8**	**2.107,6**	**32,1**

Anexo 7

Dados da leitura da expressão de BAK

Caso	Escore	Porcentagem	Intensidade	Área marrom	Área azul	Escores compostos (EC)
1	**1,0**	**69,5**	**71,6**	**4.443,1**	**1.885,2**	**49,7**
2	0,5	13,3	61,2	759,4	5.218,8	8,1
3	0,8	38,8	68,1	1.203,2	1.856,7	26,4
4	0,6	77,2	64,6	4.466,8	1.282,8	49,9
5						0,0
6	1,2	85,5	75,0	4.934,4	800,6	64,1
7	0,7	89,5	65,8	6.382,8	728,4	58,9
8	1,2	87,0	75,6	4.407,6	673,6	65,8
9	1,3	79,4	76,7	4.064,5	1.075,2	60,9
10	**1,6**	**87,7**	**84,0**	**6.304,9**	**869,3**	**73,6**
11	1,0	81,2	70,4	5.067,8	1.164,4	57,1
12	**1,7**	**85,5**	**85,9**	**5.595,1**	**917,2**	**73,4**
13	0,8	70,9	67,6	4.298,2	1.691,5	47,9
14	0,6	59,8	60,8	2.847,2	1.866,2	36,4
15	1,3	75,8	77,7	5.190,2	1.630,1	58,9
16	0,5	59,8	58,8	2.732,6	1.814,6	35,1
17	**0,5**	**37,7**	**60,1**	**2.520,6**	**3.884,8**	**22,7**
18	**0,6**	**39,3**	**63,3**	**2.146,4**	**3.341,5**	**24,9**
19	0,7	75,0	65,8	3.704,8	1.219,2	49,4
20	1,7	72,8	84,0	2.824,0	1.030,4	61,2
21	1,3	70,3	77,6	4.144,3	1.737,6	54,6
22	0,9	91,6	68,4	5.438,2	486,4	62,6
23	0,7	87,1	66,0	5.352,0	781,0	57,5
24	0,7	75,1	65,6	3.734,2	1.263,4	49,2
25	1,3	95,5	76,6	5.961,0	268,2	73,2
26	0,8	42,7	68,2	2.943,9	3.984,9	29,1
27	0,8	87,5	68,0	5.321,6	747,8	59,5
28	1,5	50,6	82,1	3.280,6	3.194,5	41,6
29	0,8	61,5	67,0	2.729,8	1.671,0	41,2
30	0,4	57,5	56,8	1.810,0	1.400,6	32,7
31	0,4	84,3	56,8	4.784,4	890,8	47,9
32	0,6	86,0	64,4	4.854,6	784,6	55,4
33	0,8	48,0	66,4	1.755,0	1.837,6	31,9
34	0,4	59,9	54,2	2.012,4	1.326,2	32,5
35	1,1	69,3	72,4	4.465,3	2.006,8	50,1
36	1,7	93,3	85,6	5.371,6	386,2	79,9
37	**1,1**	**74,3**	**71,8**	**4.340,7**	**1.475,5**	**53,4**
38	1,0	89,8	70,2	5.534,4	653,2	63,0
39	1,4	65,4	76,8	2.809,2	1.443,2	50,2
40	0,9	76,2	68,4	4.204,2	1.249,6	52,1
41	1,1	84,0	73,0	4.410,0	715,0	61,4
42	1,0	51,9	71,6	2.610,2	2.397,2	37,1
43	**1,8**	**93,1**	**87,1**	**6.288,2**	**446,7**	**81,1**
44	**0,8**	**19,7**	**66,7**	**1.116,4**	**4.583,4**	**13,1**
45	1,1	75,6	72,2	3.408,4	1.096,8	54,6
46	0,8	55,8	65,4	3.362,6	1.734,0	36,5

Caso	Escore	Porcentagem	Intensidade	Área marrom	Área azul	Escores compostos (EC)
47	0,7	84,7	66,2	3.695,8	645,0	56,1
48	0,7	39,9	64,6	2.348,6	3.455,6	25,8
49	2,0	74,4	92,5	5.222,9	1.750,3	68,8
50	**1,5**	**50,4**	**80,8**	**1.005,5**	**1.016,3**	**40,7**
51	1,3	94,6	76,2	6.000,2	321,4	72,1
52	**0,6**	**32,0**	**62,4**	**1.652,2**	**3.180,2**	**20,0**
53	1,2	69,1	74,2	3.817,0	1.665,0	51,3
54	1,5	89,5	79,7	5.956,0	692,0	71,3
55	**1,5**	**63,9**	**80,6**	**2.052,2**	**1.177,0**	**51,5**
56	**2,8**	**83,0**	**116,9**	**2.360,4**	**418,3**	**96,9**
57	0,5	44,1	58,8	1.898,0	2.483,2	26,0
58	1,1	74,3	73,2	3.889,9	1.252,3	54,3
59	0,5	60,2	61,0	4.013,6	2.537,9	36,8
60	0,5	69,7	62,0	3.471,4	1.476,2	43,2
61	0,4	26,6	56,3	1.116,8	3.073,2	14,9
62	1,2	72,8	74,5	4.378,0	1.650,8	54,2
63	0,8	84,9	68,2	5.563,0	963,8	57,9
64	0,9	72,6	69,8	4.937,3	1.839,1	50,7
65	1,3	73,0	76,5	4.428,6	1.617,0	55,8
66	0,5	72,5	62,6	4.661,2	1.766,0	45,4
67	0,7	59,6	64,0	2.790,6	1.910,0	38,1
68	2,0	92,6	94,5	6.832,1	537,2	87,4
69	0,8	21,9	65,6	440,0	1.615,6	14,4
Nevos-controle						
	0,5	**24,1**	**58,8**	**924,1**	**2.750,5**	**14,2**
	0,5	**29,1**	**59,6**	**1.499,8**	**3.302,4**	**17,3**
	0,5	**50,4**	**57,6**	**2.747,9**	**2.656,8**	**29,0**
	0,8	**73,5**	**67,2**	**4.989,1**	**1.807,0**	**49,4**
	0,5	**21,3**	**57,7**	**881,7**	**3.218,3**	**12,3**
	0,5	**20,8**	**57,6**	**572,5**	**2.452,6**	**12,0**
	0,8	**49,0**	**66,0**	**2.715,0**	**2.789,3**	**32,3**
	0,5	**52,2**	**59,6**	**3.070,4**	**2.626,4**	**31,1**
	0,6	**53,4**	**62,0**	**2.882,0**	**2.407,2**	**33,1**
	0,4	**8,9**	**47,8**	**245,2**	**2.160,6**	**4,3**

Anexo 8

Dados da leitura da expressão de Apaf-1

Caso	Escore	Porcentagem	Intensidade	Área marrom	Área azul	Escores compostos (EC)
1	**0,5**	**25,8**	**58,1**	**1.264,1**	**3.465,6**	**15,0**
2						
3	0,8	11,2	67,8	82,1	692,0	7,6
4						
5						
6	0,6	72,6	62,4	3.715,0	1.408,0	45,3
7	0,4	89,6	50,6	3.836,8	464,4	45,4
8	0,5	52,4	59,6	1.946,8	1.768,4	31,2
9	0,7	42,5	65,0	1.658,2	2.089,7	27,6
10	**0,4**	**38,2**	**54,1**	**2.768,1**	**4.557,2**	**20,7**
11	0,5	84,6	60,4	5.344,6	965,6	51,1
12	**0,5**	**56,5**	**58,9**	**4.358,9**	**3.047,3**	**33,3**
13	0,4	35,4	50,2	1.158,3	2.102,2	17,8
14	0,4	76,6	53,2	4.250,2	1.286,2	40,7
15	0,4	26,9	50,9	1.019,2	2.696,0	13,7
16	0,4	63,0	55,0	3.691,4	2.168,4	34,6
17	**0,4**	**4,5**	**47,4**	**129,6**	**2.651,3**	**2,1**
18	**0,4**	**12,3**	**53,7**	**477,3**	**3.432,3**	**6,6**
19	0,5	83,4	60,2	3.506,2	687,2	50,2
20	0,7	77,5	62,4	2.524,0	770,2	48,3
21	0,5	28,0	59,4	1.541,8	3.556,7	16,6
22	0,4	80,4	51,4	3.176,0	722,0	41,3
23	0,4	53,7	52,6	3.653,4	3.131,4	28,3
24	0,5	79,0	59,6	3.374,6	870,6	47,1
25	0,5	78,5	57,2	3.961,4	1.035,2	44,9
26	0,4	1,8	53,9	91,8	4.917,1	0,9
27	0,4	60,9	53,8	4.347,0	2.727,0	32,7
28	0,4	7,7	56,3	530,7	5.723,3	4,3
29	0,7	48,2	66,2	1.684,4	1.778,6	31,9
30	0,4	61,8	53,0	1.420,2	900,0	32,8
31						
32	0,4	51,5	53,6	1.321,8	1.238,6	27,6
33	0,6	29,1	61,3	883,8	2.264,0	17,8
34	0,4	75,5	50,2	3.095,2	1.013,2	37,9
35	0,4	32,0	51,3	1.705,7	3.524,5	16,4
36	0,7	83,0	64,2	5.605,8	1.115,8	53,3
37	**0,4**	**49,1**	**54,6**	**2.300,6**	**2.275,0**	**26,8**
38	0,4	59,5	51,8	2.797,2	1.912,8	30,8
39	1,0	77,1	70,4	2.916,4	842,6	54,3
40	0,5	86,9	59,6	5.009,2	728,2	51,8
41	1,1	82,5	73,0	2.311,8	478,6	60,2
42	0,5	69,9	58,0	3.399,4	1.461,6	40,5
43	**0,4**	**37,2**	**49,5**	**1.746,7**	**2.077,0**	**18,4**
44	**0,4**	**3,4**	**55,2**	**128,1**	**3.130,6**	**1,9**
45	0,6	79,7	64,4	3.537,2	890,6	51,3
46	0,4	5,7	46,7	140,1	1.943,7	2,7

Caso	Escore	Porcentagem	Intensidade	Área marrom	Área azul	Escores compostos (EC)
47	0,5	29,8	57,4	744,2	1.742,2	17,1
48	0,4	59,9	52,0	3.254,8	2.190,0	31,1
49	0,4	19,2	54,0	1.468,3	3.899,4	10,4
50	**1,2**	**19,4**	**74,0**	**341,2**	**1.615,2**	**14,3**
51	0,4	73,1	56,0	3.041,8	1.122,4	40,9
52	**0,6**	**6,2**	**61,7**	**142,8**	**2.336,6**	**3,8**
53	0,4	61,8	51,8	3.558,8	2.195,0	32,0
54	0,4	33,6	47,7	1.344,0	2.582,2	16,0
55	**1,0**	**51,0**	**70,4**	**1.160,2**	**1.172,8**	**35,9**
56	**1,3**	**55,0**	**75,6**	**1.248,9**	**571,2**	**41,6**
57	0,4	85,1	53,6	5.566,4	961,2	45,6
58	0,6	34,3	58,8	880,1	1.573,0	20,2
59	0,4	18,6	48,7	487,0	1.934,7	9,1
60	0,3	40,8	46,4	230,0	330,6	18,9
61	0,4	2,9	47,6	42,5	1.371,1	1,4
62	0,8	37,8	66,3	1.228,8	2.047,3	25,0
63	0,4	58,1	56,4	3.827,4	2.756,0	32,8
64	0,4	9,3	49,6	359,8	2.928,0	4,6
65	0,5	44,4	59,7	2.584,0	3.215,5	26,5
66	0,4	65,5	51,6	2.587,2	1.335,2	33,8
67	0,9	62,8	69,0	1.713,8	1.008,2	43,4
68	0,4	40,7	52,0	2.685,8	4.041,1	21,2
69	0,5	43,5	59,0	1.180,0	1.454,2	25,6
Nevos-controle						
	0,4	**3,3**	**48,0**	**89,5**	**1.929,6**	**1,6**
	0,4	**5,6**	**49,9**	**193,1**	**2.423,1**	**2,8**
	0,3	**6,8**	**45,3**	**171,1**	**1.486,3**	**3,1**
	0,4	**15,8**	**48,4**	**554,1**	**3.088,5**	**7,7**
	0,4	**1,9**	**51,2**	**34,7**	**2.007,8**	**1,0**
	0,4	**1,7**	**48,3**	**15,8**	**1.719,0**	**0,8**
	0,4	**15,0**	**53,6**	**563,1**	**3.236,6**	**8,1**
	0,4	**5,7**	**47,3**	**120,1**	**1.830,3**	**2,7**
	0,4	**5,4**	**53,6**	**133,2**	**2.373,6**	**2,9**
	0,3	**9,9**	**44,4**	**180,4**	**1.562,6**	**4,4**

Anexo 9

Dados da leitura da expressão de Caspase3 (citoplasma)

Caso	Escore	Porcentagem	Intensidade	Área marrom	Área azul	Escores compostos (EC)
1	**0,5**	**48,1**	**59,8**	**3.347,1**	**3.344,8**	**28,8**
2	0,3	48,1	46,2	1.212,8	1.294,0	22,2
3	0,4	8,6	33,2	213,6	997,0	2,9
4	0,4	91,3	48,4	5.067,8	487,4	44,2
5	0,5	75,5	57,7	5.363,7	1.622,3	43,5
6	0,5	93,5	58,6	6.965,2	481,0	54,8
7	0,4	84,5	51,4	7.293,4	1.331,2	43,4
8	0,5	90,5	58,0	3.712,4	395,4	52,5
9	0,6	58,7	73,9	4.571,2	3.217,9	43,4
10	**0,5**	**43,3**	**56,8**	**3.413,1**	**4.472,5**	**24,6**
11	0,4	90,8	54,0	6.637,0	665,0	49,0
12	**0,6**	**57,2**	**63,9**	**5.052,9**	**3.724,5**	**36,5**
13	0,5	53,3	58,7	3.766,6	3.253,5	31,3
14	0,3	1,2	44,5	11,5	784,0	0,5
15	0,4	32,8	55,4	2.097,2	4.074,8	18,1
16	0,3	37,6	43,0	571,0	914,4	16,2
17	**0,4**	**13,3**	**53,6**	**758,5**	**4.452,5**	**7,1**
18	**0,4**	**10,8**	**56,0**	**508,0**	**4.231,5**	**6,0**
19	0,4	92,7	53,0	3.727,6	288,4	49,1
20						
21	0,6	41,1	60,5	2.859,5	3.673,2	24,9
22						
23						
24						
25						
26	0,4	14,6	56,0	863,1	4.902,5	8,2
27	0,4	46,0	51,6	1.286,2	1.498,0	23,7
28	0,6	14,3	61,5	1.031,0	6.027,7	8,8
29						
30						
31						
32						
33	0,8	29,5	62,1	1.304,6	2.788,1	18,3
34						
35	0,4	28,3	54,9	1.753,8	4.260,6	15,5
36						
37	**0,4**	**49,1**	**55,6**	**2.969,3**	**2.935,2**	**27,3**
38						
39						
40						
41						
42						
43	**0,2**	**25,9**	**26,4**	**1.921,8**	**1.731,9**	**6,8**
44	**0,6**	**3,2**	**62,5**	**153,0**	**4.432,2**	**2,0**
45						
46	0,4	29,2	51,3	1.747,7	2.997,5	15,0

Caso	Escore	Porcentagem	Intensidade	Área marrom	Área azul	Escores compostos (EC)
47						
48						
49	0,4	28,9	44,6	2.629,2	3.170,9	12,9
50	**1,7**	**33,1**	**83,8**	**1.169,3**	**2.365,0**	**27,7**
51						
52	**0,5**	**18,5**	**59,2**	**838,7**	**3.228,7**	**11,0**
53						
54	0,2	22,9	26,3	1.330,9	1.514,0	6,0
55	**0,7**	**16,8**	**39,4**	**714,4**	**1.347,3**	**6,6**
56	**1,8**	**47,9**	**87,4**	**2.062,2**	**1.682,8**	**41,8**
57						
58	0,9	25,1	68,2	891,5	2.445,5	17,1
59	0,4	26,3	52,4	1.247,6	3.374,6	13,8
60						
61	0,4	3,1	49,7	77,0	2.412,6	1,5
62	0,8	33,8	66,0	1.799,7	3.338,2	22,3
63	0,4	58,3	51,6	3.118,8	2.203,4	30,1
64	0,5	60,0	59,4	5.368,1	3.421,6	35,7
65	0,5	48,9	58,9	3.686,2	3.456,9	28,8
66						
67						
68	0,4	43,7	55,9	3.626,4	4.605,6	24,4
69						
Nevos-controle						
	0,4	**1,8**	**49,1**	**45,9**	**2.498,1**	**0,9**
	0,4	**1,4**	**51,7**	**43,4**	**3.028,4**	**0,7**
	0,4	**3,2**	**46,9**	**87,9**	**2.513,4**	**1,5**
	0,4	**11,3**	**50,8**	**559,2**	**4.052,1**	**5,7**
	0,4	**2,1**	**53,5**	**69,4**	**3.165,5**	**1,1**
	0,4	**2,3**	**49,6**	**47,0**	**2.477,3**	**1,2**
	0,6	**4,7**	**57,9**	**200,8**	**4.085,8**	**2,7**
	0,4	**3,7**	**48,8**	**124,8**	**2.916,2**	**1,8**
	0,5	**7,1**	**56,4**	**270,7**	**3.317,0**	**4,0**
	0,3	**9,7**	**40,6**	**117,8**	**1.103,0**	**3,9**

Anexo 10

Dados da leitura da expressão de Caspase9 (citoplasma)

Caso	Escore	Porcentagem	Intensidade	Área marrom	Área azul	Escores compostos (EC)
1	**0,5**	**34,5**	**60,2**	**1.545,6**	**2.620,6**	**20,8**
2	0,4	94,7	52,2	1.126,4	63,4	49,4
3	0,3	13,6	32,0	223,7	599,0	4,4
4	0,4	67,1	55,6	2.237,0	1.076,4	37,3
5	0,6	73,4	62,5	4.673,0	1.687,0	45,9
6	0,5	28,7	61,0	319,0	926,0	17,5
7	0,4	66,6	51,6	1.236,6	666,2	34,4
8	0,6	70,1	62,4	2.956,8	1.264,0	43,8
9	0,5	25,1	35,3	1.190,6	1.164,3	8,8
10	**0,5**	**43,6**	**57,5**	**2.895,5**	**3.704,8**	**25,1**
11	0,5	40,7	60,2	1.747,4	2.563,4	24,5
12	**0,6**	**59,9**	**62,8**	**4.647,4**	**2.832,9**	**37,6**
13	0,4	54,8	57,0	3.016,1	2.367,4	31,2
14						0,0
15	0,5	45,2	57,1	2.936,8	3.170,6	25,8
16	0,4	52,6	53,8	882,4	771,2	28,3
17	**0,4**	**15,7**	**54,3**	**720,2**	**3.661,1**	**8,5**
18	**0,5**	**15,7**	**57,7**	**762,9**	**4.176,3**	**9,1**
19	0,7	66,8	65,0	2.253,0	1.123,6	43,4
20	1,0	41,2	71,4	1.050,4	1.568,6	29,4
21	0,5	21,4	59,1	949,3	2.322,4	12,7
22	0,4	70,3	54,6	952,4	426,4	38,4
23	0,4	15,5	53,2	192,8	1.086,8	8,2
24	0,4	87,7	55,4	325,0	43,0	48,6
25	0,4	72,9	57,0	2.188,6	798,2	41,5
26	0,4	9,0	54,8	382,0	3.370,3	4,9
27	0,5	51,1	60,8	2.264,2	2.108,2	31,1
28	0,5	19,6	60,4	1.241,9	5.163,6	11,8
29	0,6	33,2	64,8	450,6	1.039,2	21,5
30	0,4	37,5	56,6	372,8	571,2	21,2
31	0,4	5,5	48,5	10,5	178,5	2,7
32	0,4	11,2	55,0	124,2	1.012,8	6,2
33	0,6	32,9	60,6	804,5	1.615,8	20,0
34	0,4	63,3	52,6	1.714,4	993,0	33,3
35	0,4	30,3	54,6	1.360,5	3.121,9	16,5
36	0,5	45,9	61,2	2.593,2	3.045,8	28,1
37	**0,4**	**44,2**	**57,1**	**1.772,4**	**2.096,3**	**25,2**
38	0,5	63,5	60,4	4.084,6	2.348,8	38,4
39	0,7	55,8	64,4	2.057,4	1.589,6	36,0
40	0,5	76,4	63,0	4.203,8	1.284,0	48,1
41	0,7	59,2	65,4	2.104,2	1.452,6	38,7
42	0,5	40,8	62,4	1.455,2	2.210,8	25,4
43	**0,2**	**31,8**	**28,6**	**2.142,7**	**1.214,9**	**9,1**
44	**0,5**	**7,2**	**59,5**	**326,6**	**4.294,4**	**4,3**
45	0,5	40,2	62,0	1.113,8	1.826,4	24,9
46	0,4	29,5	53,4	1.623,6	2.428,4	15,8

Caso	Escore	Porcentagem	Intensidade	Área marrom	Área azul	Escores compostos (EC)
47	0,5	69,3	60,2	1.751,0	765,8	41,7
48	0,4	15,0	50,0	287,2	1.583,0	7,5
49	0,2	24,9	29,2	1.590,2	1.435,0	7,2
50	**1,0**	**18,9**	**70,7**	**439,6**	**1.602,7**	**13,4**
51	0,4	80,0	55,8	3.261,8	752,2	44,6
52	**0,5**	**18,7**	**60,6**	**494,6**	**1.994,0**	**11,3**
53	0,4	35,7	51,4	923,4	1.653,2	18,4
54	0,2	34,0	28,2	1.906,1	859,8	9,6
55	**1,3**	**32,5**	**76,0**	**344,0**	**879,8**	**24,7**
56	**0,9**	**35,9**	**55,1**	**769,9**	**373,6**	**19,8**
57	0,5	25,7	62,4	823,2	2.306,0	16,1
58	0,6	44,5	62,1	1.726,4	1.878,0	27,6
59	0,4	31,8	54,0	1.053,0	2.188,0	17,2
60	0,5	32,9	59,2	965,8	1.948,6	19,5
61	0,4	8,8	53,6	187,1	2.021,3	4,7
62	0,8	27,6	67,1	1.151,3	2.843,9	18,5
63	0,6	55,7	64,8	258,8	206,8	36,1
64	0,5	40,1	56,1	2.129,6	2.163,3	22,5
65	0,6	52,3	61,4	2.820,3	2.190,9	32,1
66	0,6	30,0	63,2	352,2	816,8	19,0
67	0,8	32,5	68,0	920,2	1.914,6	22,1
68	0,5	67,1	59,0	5.121,7	2.534,2	39,6
69	0,7	24,9	65,4	332,8	992,0	16,3
Nevos-controle						
	0,4	**0,8**	**51,9**	**14,4**	**1.993,3**	**0,4**
	0,3	**4,5**	**40,2**	**133,8**	**1.912,2**	**1,8**
	0,4	**12,0**	**50,7**	**265,4**	**1.734,1**	**6,1**
	0,4	**34,2**	**54,8**	**1.593,9**	**2.952,8**	**18,8**
	0,4	**11,9**	**55,3**	**333,7**	**2.253,7**	**6,6**
	0,4	**4,1**	**53,5**	**52,5**	**2.081,6**	**2,2**
	0,6	**21,8**	**59,7**	**820,0**	**2.863,9**	**13,0**
	0,4	**23,0**	**52,7**	**660,9**	**2.059,7**	**12,1**
	0,4	**24,0**	**56,7**	**793,6**	**2.026,7**	**13,6**
	0,4	**9,0**	**48,4**	**651,4**	**6.597,4**	**4,4**

Anexo 11

Dados da leitura da expressão de Caspase8 (citoplasma)

Caso	Escore	Porcentagem	Intensidade	Área marrom	Área azul	Escores compostos (EC)
1	**2,2**	**59,3**	**100,0**	**4.666,2**	**3.203,6**	**59,3**
2	1,5	83,3	79,4	5.831,4	1.147,6	66,1
3	1,5	6,7	80,4	122,6	1.895,2	5,4
4	2,3	87,1	102,8	7.848,6	1.141,8	89,6
5						0,0
6	2,1	84,3	97,2	4.717,2	856,4	81,9
7	2,3	87,2	103,4	6.816,2	1.011,6	90,2
8	1,8	72,6	87,6	4.919,2	1.851,0	63,6
9	2,7	61,0	113,8	4.350,8	2.801,8	69,4
10	**2,4**	**66,5**	**106,8**	**5.713,7**	**2.889,5**	**70,9**
11						0,0
12	**2,7**	**70,2**	**113,7**	**6.495,0**	**2.659,7**	**79,8**
13	2,2	64,1	100,9	5.503,6	3.021,6	64,7
14	2,0	78,5	93,0	5.575,4	1.527,4	73,0
15	1,9	45,4	90,8	3.832,4	4.483,1	41,2
16	1,0	65,9	70,6	2.634,0	1.358,8	46,5
17	**1,6**	**24,1**	**82,1**	**1.746,1**	**5.222,2**	**19,8**
18	**1,8**	**26,9**	**88,8**	**1.748,3**	**4.542,6**	**23,9**
19	2,4	89,4	106,6	6.710,2	759,8	95,3
20	1,5	97,9	80,2	4.443,6	86,4	78,5
21	2,3	69,6	103,4	5.657,5	2.487,0	71,9
22	2,0	99,6	92,8	8.553,0	27,4	92,5
23	2,7	88,8	113,4	7.757,8	948,2	100,7
24	2,2	66,3	98,4	2.859,4	1.503,6	65,2
25	2,7	90,6	115,2	7.770,4	786,4	104,4
26	1,8	20,8	88,3	1.782,1	6.822,2	18,4
27	1,8	83,7	88,2	5.648,0	1.101,4	73,8
28	2,3	29,2	102,2	2.617,5	6.198,0	29,9
29	2,0	37,6	94,2	2.680,8	4.429,6	35,4
30						0,0
31						0,0
32	2,2	59,0	98,2	3.909,6	2.710,6	57,9
33	1,8	46,5	89,5	2.182,9	2.496,5	41,6
34	1,6	69,5	80,8	4.647,4	2.011,2	56,2
35	2,3	61,4	102,7	5.434,2	3.434,7	63,0
36	2,9	71,8	121,2	5.215,4	2.023,0	87,1
37	**1,9**	**47,3**	**91,0**	**3.113,9**	**2.812,9**	**43,0**
38	1,9	77,8	91,0	6.695,0	1.878,4	70,8
39	1,9	68,1	91,2	4.385,4	1.992,6	62,1
40	1,9	70,9	89,6	4.978,8	2.040,6	63,5
41	2,1	72,5	96,0	4.007,4	1.489,2	69,6
42	1,3	43,5	76,6	1.500,8	1.855,0	33,3
43	**2,0**	**68,2**	**92,5**	**6.202,9**	**2.906,4**	**63,1**
44	**1,8**	**4,9**	**87,5**	**399,4**	**7.731,3**	**4,2**
45	1,7	38,2	83,8	1.689,6	2.692,4	32,0
46	1,4	62,8	77,2	5.309,4	2.856,6	48,5

Caso	Escore	Porcentagem	Intensidade	Área marrom	Área azul	Escores compostos (EC)
47	0,8	74,4	66,8	5.109,0	1.769,4	49,7
48	1,2	23,0	74,4	963,0	3.111,2	17,1
49	2,6	74,7	110,6	7.585,4	2.560,8	82,6
50	**2,6**	**20,2**	**111,1**	**752,4**	**2.914,2**	**22,5**
51	1,4	89,2	77,4	6.234,0	737,4	69,1
52	**1,6**	**23,9**	**83,2**	**1.463,7**	**4.134,1**	**19,8**
53	0,8	69,3	67,4	2.876,6	1.321,4	46,7
54	1,8	76,4	87,8	6.140,5	1.820,1	67,1
55	**2,6**	**30,8**	**110,4**	**1.552,2**	**3.576,8**	**34,0**
56	**3,7**	**81,5**	**143,4**	**2.611,6**	**593,2**	**116,8**
57	1,3	57,2	76,2	2.631,8	1.939,0	43,6
58	2,0	51,5	95,4	3.681,0	3.271,1	49,1
59	1,5	32,1	79,7	2.298,4	4.335,2	25,6
60	1,8	77,3	88,0	5.257,0	1.481,4	68,0
61	1,2	6,5	74,3	204,6	2.918,2	4,8
62	2,0	30,1	93,6	1.916,3	4.208,1	28,2
63	1,9	94,1	92,0	8.264,8	520,2	86,6
64	1,4	48,3	78,5	3.478,9	3.730,6	37,9
65	1,9	46,9	91,5	3.657,5	3.737,5	42,9
66	1,6	68,9	82,0	4.663,0	1.835,4	56,5
67	1,7	68,1	86,2	3.430,6	1.603,2	58,7
68	2,2	65,1	99,5	6.100,6	3.278,7	64,7
69	1,5	19,9	81,8	581,2	1.714,4	16,3
Nevos-controle						
	1,4	**34,4**	**77,6**	**1.622,7**	**2.948,6**	**26,7**
	1,4	**14,0**	**77,9**	**328,0**	**2.204,4**	**10,9**
	1,7	**32,2**	**85,0**	**2.041,3**	**4.138,9**	**27,3**
	1,5	**16,1**	**79,2**	**656,9**	**3.289,4**	**12,7**
	1,5	**26,7**	**80,0**	**1.080,5**	**2.823,7**	**21,4**
	1,3	**13,5**	**77,2**	**414,7**	**2.209,6**	**10,4**
	1,7	**23,4**	**86,1**	**1.543,1**	**4.657,3**	**20,1**
	1,5	**37,9**	**80,2**	**2.935,9**	**4.821,8**	**30,4**
	1,3	**41,8**	**75,8**	**2.058,2**	**2.726,3**	**31,6**
	1,8	**60,7**	**89,2**	**4.026,6**	**2.471,0**	**54,2**

Anexo 12

Dados da leitura da expressão de FasL (membrana)

Caso	Escore	Porcentagem	Intensidade	Área marrom	Área azul	Escores compostos (EC)
1	**0,9**	**28,3**	**69,0**	**473,9**	**1.279,1**	**19,5**
2	0,6	87,0	64,4	1.660,4	267,2	56,0
3	1,1	1,2	71,7	2,2	256,9	0,8
4	0,8	87,0	67,6	2.077,2	273,6	58,8
5	0,7	63,8	66,6	1.183,0	690,0	42,5
6	1,0	59,8	70,0	356,4	199,0	41,9
7	0,9	99,2	68,6	1.407,4	9,4	68,1
8						
9	1,2	31,4	73,3	332,5	757,5	23,0
10	**0,9**	**53,4**	**69,0**	**1.395,2**	**1.258,9**	**36,8**
11	0,8	68,3	68,2	1.377,8	641,8	46,6
12	**1,0**	**67,1**	**70,1**	**1.725,4**	**760,8**	**47,0**
13	0,6	55,3	64,8	638,6	541,1	35,8
14	0,6	76,6	64,4	1.311,6	419,6	49,4
15	0,8	72,4	67,6	1.663,5	634,9	48,9
16	0,6	68,9	64,4	1.521,8	682,4	44,4
17	**0,6**	**23,8**	**64,8**	**280,4**	**973,3**	**15,5**
18	**0,8**	**32,8**	**67,8**	**593,9**	**1.139,2**	**22,2**
19	1,0	96,4	70,6	1.607,8	60,8	68,1
20	0,8	88,2	67,2	1.685,2	227,4	59,2
21	0,9	55,8	68,7	1.081,6	825,8	38,4
22	0,8	96,7	67,4	1.831,0	64,2	65,2
23	0,6	59,7	63,4	407,4	314,0	37,9
24	1,0	75,6	70,0	1.210,4	379,6	52,9
25	1,0	91,9	71,0	2.712,4	236,0	65,2
26	0,8	14,0	67,3	201,9	1.224,3	9,4
27	0,9	97,4	69,2	2.684,2	61,0	67,4
28	0,9	14,5	68,9	330,4	2.028,9	10,0
29	1,0	44,0	71,4	684,8	901,0	31,4
30	1,0	19,2	70,4	338,8	1.442,2	13,5
31	0,9	77,0	68,8	1.085,6	326,8	53,0
32	1,0	71,9	71,6	944,2	372,8	51,5
33	0,9	31,8	68,6	213,1	523,5	21,8
34						
35	0,7	35,4	65,4	547,0	811,8	23,2
36	1,0	63,9	71,6	1.371,0	760,8	45,7
37	**0,6**	**27,3**	**64,2**	**250,2**	**571,9**	**17,5**
38	0,7	65,7	66,2	1.593,0	732,8	43,5
39						
40	1,3	80,7	75,2	1.063,6	271,0	60,7
41	1,3	57,7	75,4	427,2	313,8	43,5
42	0,9	73,1	69,6	915,8	331,0	50,8
43	**0,5**	**63,7**	**63,4**	**1.543,3**	**853,2**	**40,4**
44	**0,9**	**4,4**	**68,7**	**32,3**	**1.016,6**	**3,0**
45	1,0	43,3	71,4	190,2	319,8	30,9
46	0,5	25,1	62,4	318,8	745,0	15,6

Caso	Escore	Porcentagem	Intensidade	Área marrom	Área azul	Escores compostos (EC)
47	0,6	27,6	64,0	327,6	812,2	17,6
48	0,8	41,2	68,0	430,8	614,4	28,0
49	0,7	47,9	66,7	1.680,9	1.277,4	32,0
50	**1,3**	**14,8**	**75,7**	**103,4**	**560,3**	**11,2**
51	0,6	96,9	63,6	1.410,2	45,6	61,6
52	**0,7**	**33,5**	**66,8**	**335,6**	**554,8**	**22,4**
53						
54	0,6	67,8	63,4	1.222,5	540,4	43,0
55	**1,3**	**35,4**	**75,0**	**163,6**	**267,9**	**26,5**
56	**1,3**	**65,2**	**75,8**	**416,9**	**91,8**	**49,4**
57	0,5	100,0	61,0	5.276,2	1,8	61,0
58	0,8	53,9	67,3	455,2	304,3	36,2
59	0,5	14,4	62,5	103,8	547,6	9,0
60						
61	0,5	3,7	62,7	16,8	547,8	2,3
62	1,1	23,5	71,9	204,3	750,8	16,9
63	0,9	85,4	68,4	1.466,8	247,4	58,4
64	0,6	48,1	64,0	868,2	793,4	30,8
65	0,8	52,3	67,4	1.138,2	996,6	35,3
66	0,6	62,5	65,0	231,4	142,2	40,6
67	0,6	99,5	62,0	2.495,4	12,0	61,7
68	0,7	63,9	65,7	1.483,1	842,8	42,0
69						
Nevos-controle						
	0,6	**2,5**	**63,0**	**28,8**	**993,6**	**1,6**
	0,6	**2,5**	**64,7**	**32,0**	**1.292,1**	**1,6**
	0,5	**3,7**	**62,5**	**36,3**	**975,9**	**2,3**
	0,5	**3,8**	**62,6**	**30,7**	**1.027,0**	**2,4**
	0,6	**1,6**	**64,5**	**12,8**	**946,6**	**1,0**
	0,5	**1,5**	**62,3**	**5,9**	**733,9**	**0,9**
	0,7	**6,7**	**66,1**	**90,6**	**1.156,1**	**4,4**
	0,5	**3,8**	**61,8**	**27,3**	**717,3**	**2,3**
	0,7	**12,3**	**65,8**	**134,5**	**951,4**	**8,1**

Anexo 13

Dados da leitura da expressão de FasL (citoplasma)

Caso	Escore	Porcentagem	Intensidade	Área marrom	Área azul	Escores compostos (EC)
1	**1,0**	**37,8**	**70,3**	**2.070,2**	**3.321,7**	**26,6**
2	1,1	76,2	72,2	6.307,2	1.943,2	55,0
3	1,1	7,8	71,8	196,5	2.262,2	5,6
4	1,0	73,8	71,4	5.477,2	1.941,2	52,7
5	0,9	76,5	68,4	4.509,8	1.370,8	52,3
6	1,0	69,7	71,0	3.100,6	1.321,0	49,5
7	0,7	78,2	65,2	3.789,8	1.008,4	51,0
8	1,1	76,0	73,2	3.697,0	1.159,4	55,7
9	1,3	33,4	76,2	1.740,9	3.478,5	25,5
10	**1,0**	**62,1**	**70,3**	**3.075,3**	**1.827,4**	**43,7**
11	1,1	73,7	72,4	4.219,6	1.539,8	53,3
12	**1,0**	**56,7**	**71,1**	**4.167,1**	**3.116,6**	**40,3**
13	0,6	45,4	63,8	2.212,5	2.711,2	28,9
14	0,7	69,9	65,4	3.584,6	1.558,8	45,7
15	0,8	59,2	67,9	4.114,5	2.842,7	40,2
16	0,7	73,2	66,4	4.398,6	1.608,2	48,6
17	**0,6**	**29,1**	**63,5**	**1.551,8**	**3.528,1**	**18,5**
18	**0,8**	**33,6**	**67,2**	**1.716,8**	**3.057,1**	**22,6**
19	1,2	75,6	74,0	4.601,6	1.481,4	55,9
20	1,0	83,4	71,0	6.554,4	1.302,4	59,2
21	0,8	49,8	68,1	2.839,0	2.786,2	33,9
22	1,1	80,5	72,2	5.206,8	1.246,0	58,1
23	0,5	51,1	61,6	1.659,8	1.517,0	31,5
24	1,0	68,8	70,6	3.647,2	1.638,8	48,6
25	1,1	78,2	73,0	6.315,6	1.744,2	57,1
26	0,7	18,8	66,4	1.143,6	4.996,0	12,5
27	1,2	75,6	74,0	5.351,2	1.725,2	56,0
28	0,9	27,1	69,7	1.408,5	3.872,6	18,9
29	1,4	61,3	77,4	3.989,8	2.530,0	47,4
30	1,2	54,7	73,4	2.551,0	1.946,0	40,1
31	1,1	54,4	72,2	3.069,6	2.559,0	39,3
32	1,3	70,8	75,4	4.350,0	1.808,6	53,3
33	1,0	41,2	70,6	1.470,9	2.113,1	29,1
34	1,0	76,2	71,6	5.271,6	1.676,2	54,6
35	0,6	40,4	63,8	1.857,1	2.461,5	25,8
36	1,3	59,3	75,0	4.043,8	2.759,2	44,5
37	**0,6**	**43,2**	**63,9**	**1.582,1**	**1.827,1**	**27,6**
38	0,9	62,2	68,4	4.100,2	2.493,8	42,6
39	1,3	56,6	75,0	1.952,8	1.471,6	42,5
40	1,6	63,5	81,6	5.256,0	3.053,6	51,8
41	1,5	62,0	79,8	3.388,6	2.082,4	49,4
42	1,1	54,8	73,0	2.110,2	1.755,0	40,0
43	**0,5**	**63,7**	**62,8**	**3.550,4**	**2.034,7**	**40,0**
44	**0,7**	**7,9**	**66,6**	**355,9**	**3.713,2**	**5,2**
45	1,2	48,9	73,4	1.632,4	1.721,2	35,9
46	0,5	40,4	59,9	1.504,9	1.745,9	24,2

Caso	Escore	Porcentagem	Intensidade	Área marrom	Área azul	Escores compostos (EC)
47	0,8	30,8	67,8	341,4	770,2	20,9
48	0,7	43,7	65,8	2.034,8	2.458,8	28,7
49	0,9	67,7	69,8	4.941,1	2.351,5	47,2
50	**1,7**	**29,3**	**83,8**	**1.123,5**	**2.587,2**	**24,5**
51	0,6	79,3	63,0	4.254,6	1.077,6	50,0
52	**0,7**	**33,1**	**66,2**	**1.873,8**	**3.609,3**	**21,9**
53	0,5	41,0	58,8	535,2	766,2	24,1
54	0,5	51,8	61,7	2.444,9	2.077,1	32,0
55	**1,6**	**33,6**	**82,3**	**1.566,1**	**3.088,8**	**27,7**
56	**1,7**	**46,6**	**84,5**	**1.949,5**	**1.723,0**	**39,4**
57	0,6	55,3	63,0	1.757,2	1.352,4	34,9
58	0,8	42,9	67,4	1.962,4	2.523,4	28,9
59	0,5	29,0	59,8	852,8	1.813,9	17,3
60	0,7	67,3	66,2	3.423,6	1.679,0	44,5
61	0,5	14,2	59,4	188,1	1.085,9	8,4
62	1,3	40,4	75,1	1.796,1	2.561,1	30,3
63	0,7	75,8	66,2	3.911,4	1.176,2	50,2
64	0,5	51,2	62,1	2.765,3	2.413,5	31,8
65	0,9	60,4	68,5	3.278,9	2.119,9	41,4
66	0,8	60,4	66,6	1.470,8	945,8	40,2
67	1,2	58,6	74,0	1.861,8	1.325,6	43,3
68	0,7	53,0	65,3	3.216,7	2.819,3	34,6
69	0,8	48,6	67,0	969,2	998,4	32,5
Nevos-controle						
	0,4	**13,7**	**54,2**	**123,4**	**482,7**	**7,4**
	0,6	**15,3**	**62,3**	**214,7**	**977,3**	**9,6**
	0,5	**20,1**	**58,9**	**262,1**	**867,6**	**11,8**
	0,5	**16,8**	**59,9**	**332,1**	**1.501,1**	**10,0**
	0,5	**11,3**	**61,4**	**119,9**	**838,1**	**6,9**
	0,5	**9,3**	**59,3**	**80,7**	**605,2**	**5,5**
	0,6	**22,1**	**63,7**	**530,4**	**1.646,4**	**14,1**
	0,5	**18,9**	**59,5**	**336,9**	**1.223,7**	**11,3**
	0,6	**23,2**	**64,0**	**775,0**	**1.955,2**	**14,8**
	0,6	**67,8**	**64,4**	**2.803,0**	**1.341,6**	**43,6**

Anexo 14

Dados da leitura da expressão de Fas (membrana)

Caso	Escore	Porcentagem	Intensidade	Área marrom	Área azul	Escores compostos (EC)
1	**2,1**	**4,1**	**96,3**	**33,0**	**535,6**	**4,0**
2	2,0	1,6	92,2	4,0	246,4	1,5
3						0,0
4	2,2	0,4	98,6	1,2	481,8	0,4
5	2,5	3,8	107,2	97,2	2.307,0	4,1
6	2,4	4,9	105,0	41,6	812,6	5,2
7	2,3	18,8	104,0	284,0	1.192,2	19,5
8	2,0	6,2	94,8	12,2	157,2	5,9
9	2,4	5,5	106,5	103,0	1.312,6	5,9
10	**2,4**	**7,1**	**106,2**	**161,4**	**2.129,3**	**7,5**
11	2,6	14,7	111,0	419,8	2.458,0	16,4
12	**2,7**	**10,7**	**115,8**	**233,6**	**1.980,5**	**12,3**
13	2,4	14,9	105,8	262,8	1.440,8	15,7
14	2,2	0,6	100,0	1,0	260,0	0,6
15	2,1	12,6	90,3	121,4	583,5	11,4
16	2,5	7,2	107,2	165,0	2.165,0	7,7
17	**2,6**	**18,6**	**110,9**	**357,6**	**1.885,4**	**20,6**
18	**2,7**	**3,9**	**113,6**	**69,9**	**2.111,5**	**4,4**
19	2,4	8,6	106,8	123,6	1.216,0	9,2
20	2,4	22,2	106,4	323,0	1.254,2	23,6
21	2,6	25,2	111,6	467,0	1.607,7	28,2
22	2,6	5,6	111,2	182,0	3.086,4	6,2
23	2,6	8,4	111,8	165,8	1.850,8	9,4
24	2,7	12,3	114,0	280,2	1.963,2	14,0
25	2,7	8,3	114,6	243,2	2.736,0	9,5
26	2,7	20,5	114,4	501,9	2.154,8	23,4
27	2,4	6,4	105,2	29,0	469,2	6,8
28	2,5	5,2	108,3	134,5	2.051,7	5,6
29	2,7	6,1	115,8	171,4	2.575,6	7,1
30	2,3	0,1	102,8	0,4	1.080,6	0,1
31	2,4	10,6	106,2	64,4	412,4	11,2
32	2,3	0,4	101,2	1,6	354,6	0,4
33	2,6	22,0	111,7	386,6	1.610,6	24,6
34	2,6	11,1	110,6	195,4	1.552,0	12,3
35	2,7	9,5	114,4	248,3	2.841,9	10,9
36	2,7	28,3	113,2	573,4	1.445,2	32,1
37	**2,4**	**12,1**	**105,7**	**190,0**	**1.151,8**	**12,7**
38	2,8	7,8	116,8	203,4	2.417,8	9,1
39	2,6	9,5	112,8	217,2	2.372,6	10,7
40	2,7	6,6	114,0	198,5	2.841,5	7,5
41	2,5	1,1	109,2	14,2	1.245,2	1,2
42	2,6	11,2	110,2	202,2	1.542,8	12,4
43	**2,7**	**18,0**	**114,3**	**191,9**	**929,3**	**20,6**
44	**2,7**	**9,8**	**114,2**	**217,6**	**1.939,0**	**11,2**
45	2,5	4,1	108,0	79,0	1.764,4	4,4
46	2,6	20,3	112,0	222,6	1.537,7	22,7

Caso	Escore	Porcentagem	Intensidade	Área marrom	Área azul	Escores compostos (EC)
47	2,8	7,2	116,6	243,4	3.099,4	8,4
48	2,6	3,7	110,6	105,0	2.463,6	4,0
49	2,8	15,1	118,1	126,1	855,5	17,8
50	**2,6**	**10,2**	**112,3**	**196,9**	**1.853,5**	**11,5**
51	2,6	9,0	110,4	175,2	1.833,6	9,9
52	**2,7**	**24,9**	**114,0**	**410,6**	**1.374,9**	**28,3**
53	2,7	4,6	115,6	114,4	2.374,0	5,3
54	2,6	16,2	110,9	317,5	1.714,7	18,0
55	**2,8**	**2,2**	**117,1**	**49,7**	**2.121,4**	**2,6**
56	**2,8**	**13,0**	**116,7**	**288,4**	**1.928,2**	**15,1**
57	2,7	5,4	114,4	142,6	2.623,6	6,1
58	2,5	13,5	108,3	200,2	1.232,8	14,6
59	2,7	31,1	113,2	508,1	1.198,0	35,2
60	2,6	4,6	110,6	102,6	2.198,2	5,1
61	1,9	17,0	86,5	18,3	82,6	14,7
62	2,7	16,1	115,7	180,7	1.952,1	18,6
63	2,7	23,3	113,0	474,6	1.685,2	26,3
64	2,6	18,8	112,7	351,2	1.552,7	21,2
65	2,7	11,8	114,5	237,2	1.844,6	13,5
66	2,7	3,2	113,4	109,6	3.402,0	3,6
67	2,8	6,7	116,8	195,6	2.722,8	7,8
68	2,8	5,7	116,7	120,5	1.971,6	6,6
69	2,5	4,7	108,8	73,4	1.547,8	5,1
Nevos-controle						
	2,6	**8,3**	**111,4**	**155,2**	**1.754,7**	**9,2**
	2,6	**5,4**	**111,3**	**128,3**	**2.284,7**	**6,0**
	2,7	**8,0**	**115,6**	**151,2**	**1.542,6**	**9,3**
	2,8	**3,2**	**117,2**	**29,1**	**812,3**	**3,7**
	2,6	**5,6**	**112,7**	**158,9**	**2.703,4**	**6,3**
	2,5	**3,2**	**109,4**	**58,4**	**2.020,6**	**3,5**
	2,7	**7,8**	**113,5**	**228,7**	**2.852,5**	**8,9**
	2,5	**9,4**	**109,9**	**188,3**	**1.968,5**	**10,4**
	2,5	**13,3**	**109,1**	**248,1**	**1.883,9**	**14,5**
	2,5	**2,7**	**107,6**	**47,8**	**1.758,0**	**2,9**

Anexo 15

Dados da leitura da expressão de Fas (citoplasma)

Caso	Escore	Porcentagem	Intensidade	Área marrom	Área azul	Escores compostos (EC)
1	**1,6**	**30,4**	**82,1**	**958,6**	**1.426,9**	**25,0**
2	1,6	27,8	82,2	537,4	1.596,8	22,8
3	1,1	0,3	71,9	3,1	867,2	0,2
4	1,6	24,0	83,2	401,2	1.282,2	19,9
5	2,2	58,6	100,6	1.784,2	1.226,2	58,9
6	2,0	62,3	95,0	1.292,6	755,0	59,2
7	2,1	86,8	96,2	3.014,2	448,4	83,5
8	1,6	48,1	81,6	986,6	985,4	39,2
9	2,0	60,9	92,4	1.942,3	943,9	56,2
10	**2,1**	**64,3**	**96,5**	**2.141,6**	**1.152,0**	**62,1**
11	2,4	86,1	104,6	2.810,6	454,8	90,0
12	**3,1**	**92,4**	**127,4**	**2.219,6**	**205,1**	**117,8**
13	2,0	78,0	93,8	2.780,1	738,2	73,1
14	2,0	50,0	92,3	1.118,3	1.060,7	46,2
15	1,8	33,7	88,3	1.191,2	2.007,3	29,8
16	2,2	70,5	99,6	2.259,0	958,0	70,2
17	**2,2**	**67,1**	**100,4**	**1.794,1**	**1.006,4**	**67,4**
18	**2,3**	**45,8**	**103,1**	**1.141,5**	**1.568,4**	**47,3**
19	2,1	73,7	95,2	1.658,0	591,0	70,1
20	2,1	86,8	96,8	3.267,4	504,0	84,0
21	2,4	90,8	104,4	2.924,8	274,1	94,8
22	2,8	84,9	117,8	2.626,8	459,6	100,0
23	2,3	69,5	102,8	2.421,0	1.055,6	71,5
24	2,5	72,5	108,0	1.501,4	535,2	78,3
25	2,8	84,0	117,0	2.262,6	435,4	98,3
26	2,8	86,9	118,7	2.492,0	375,9	103,2
27	1,8	66,6	89,2	1.638,2	823,4	59,4
28	2,2	29,3	98,3	1.172,9	3.061,9	28,7
29	2,7	66,7	114,6	1.797,6	903,2	76,4
30	1,8	5,7	88,2	156,6	2.749,8	5,0
31	1,8	44,0	87,4	904,6	1.038,2	38,4
32	1,6	4,6	82,2	101,8	2.180,4	3,8
33	2,6	91,5	111,1	2.483,9	247,0	101,6
34	2,3	89,8	103,6	2.780,6	314,2	93,0
35	2,9	88,0	118,9	2.283,4	373,8	104,6
36	2,7	91,9	114,2	2.623,4	221,4	105,0
37	**2,0**	**65,5**	**93,7**	**2.064,7**	**1.015,9**	**61,4**
38	3,2	90,9	128,4	1.907,8	202,4	116,7
39	2,4	69,7	104,2	1.987,6	887,2	72,6
40	2,4	57,4	104,2	1.755,8	1.220,4	59,8
41	2,1	68,1	97,2	2.631,2	1.230,0	66,2
42	2,1	34,8	98,0	1.110,4	2.098,0	34,1
43	**3,7**	**97,6**	**143,5**	**1.140,9**	**25,3**	**140,0**
44	**2,4**	**51,4**	**106,0**	**1.697,1**	**2.061,2**	**54,5**
45	2,1	65,1	95,2	2.287,8	1.241,0	61,9
46	2,6	89,5	111,0	2.223,8	327,9	99,3

Caso	Escore	Porcentagem	Intensidade	Área marrom	Área azul	Escores compostos (EC)
47	2,9	87,1	120,6	2.021,4	295,8	105,1
48	1,7	12,5	83,6	434,2	3.120,2	10,4
49	3,4	92,6	133,9	807,4	46,1	124,0
50	**2,0**	**56,4**	**92,7**	**2.337,7**	**1.757,6**	**52,3**
51	2,4	86,1	105,0	2.447,0	405,0	90,4
52	**2,8**	**91,7**	**117,7**	**2.465,0**	**229,2**	**107,8**
53	2,9	73,4	121,2	1.899,8	709,6	88,9
54	3,0	96,4	122,0	2.685,1	96,5	117,7
55	**3,4**	**71,8**	**134,7**	**1.015,8**	**468,0**	**96,8**
56	**3,0**	**93,4**	**122,1**	**1.851,3**	**140,8**	**114,1**
57	2,3	58,8	103,8	1.435,2	969,2	61,0
58	2,3	70,3	101,3	1.933,8	796,4	71,1
59	2,8	93,4	118,1	2.426,9	151,8	110,3
60	1,9	48,7	92,0	1.539,8	1.602,4	44,8
61	1,5	24,7	79,3	809,7	1.801,9	19,5
62	3,7	96,6	143,7	954,3	37,9	138,8
63	3,0	95,5	124,2	2.719,4	130,2	118,6
64	3,2	97,0	128,0	1.932,9	68,2	124,1
65	3,5	96,2	137,2	1.718,6	65,2	132,0
66	2,1	55,9	96,8	2.211,4	1.704,8	54,2
67	2,8	83,2	118,6	1.521,8	311,2	98,7
68	3,7	98,1	143,3	1.823,9	36,7	140,5
69	2,0	51,8	94,8	1.670,6	1.545,2	49,1
Nevos-controle						
	2,3	**73,6**	**102,5**	**1.632,6**	**555,5**	**75,4**
	2,7	**70,6**	**114,7**	**1.709,3**	**696,3**	**81,0**
	3,5	**96,1**	**137,3**	**1.750,9**	**62,4**	**132,0**
	4,0	**98,5**	**152,1**	**899,8**	**17,6**	**149,8**
	3,0	**80,9**	**123,8**	**2.108,8**	**481,4**	**100,1**
	2,4	**46,3**	**106,8**	**936,1**	**1.255,0**	**49,4**
	2,8	**72,5**	**116,6**	**1.723,6**	**656,1**	**84,6**
	2,6	**71,9**	**110,1**	**1.923,1**	**735,0**	**79,2**
	2,1	**57,6**	**97,8**	**1.842,3**	**1.324,2**	**56,3**
	2,3	**47,3**	**104,0**	**1.430,2**	**1.572,0**	**49,2**

Anexo 16

Valores descritivos relativos às médias±desvios-padrão da porcentagem e intensidade de expressão das proteínas da apoptose nos diferentes grupos de estudo.

Proteínas da Apoptose	Grupos de estudo							
	Nevos-controle		Melanomas					
			Geral		< 1mm		≥ 1mm	
	%	Intensidade	%	Intensidade	%	Intensidade	%	Intensidade
Bcl2	6,7±7,1	54,7±3,1	8,3±14,9	58,4±27,9	13,5±18,9	59,3±27,6	2,9±5,2	57,4±4,8
Bax	33,8±24,0	70,2±4,6	50,0±31,0	72,4±16,3	45,7±34,6	68,3±13,7	58,4±26,0	77,3±17,7
Bak	38,3±20,2	59,4±5,3	67,2±21,5	70,1±13,4	67,9±22,4	67,6±14,3	66,4±20,8	72,8±11,9
Apaf 1	7,1±5,0	49,9±3,1	45,3±27,7	53,8±15,1	60,2±26,2	51,5±19,4	29,0±19,1	56,4±7,7
Caspase3[c]	4,7±3,5	50,5±4,9	25,8±28,9	34,3±28,5	10,9±35,9	15,9±24,6	31,1±17,6	54,5±16,2
Caspase9[c]	14,5±10,8	52,4±5,3	40,6±21,8	56,3±11,4	48,6±24,0	57,4±11,2	32,0±15,3	55,2±11,6
Caspase8[c]	30,1±14,7	80,8±4,4	55,8±27,6	87,2±25,7	61,8±29,2	79,8±31,3	49,2±24,4	95,2±14,2
FasL[m]	4,3±3,4	63,7±1,6	55,4±27,6	67,8±3,6	71,0±21,7	68,0±3,6	41,0±24,5	67,7±3,7
FasL[c]	21,8±16,7	60,8±3,1	53,8±18,6	69,5±5,8	64,3±12,6	70,5±4,9	42,5±17,4	68,4±6,4
Faz[m]	6,7±3,3	111,7±3,0	10,4±7,3	107,9±14,6	7,7±6,0	109,0±6,1	13,2±7,7	106,8±20,5
Fas[c]	71,5±17,8	116,6±16,9	67,2±25,7	105,4±16,9	63,1±25,1	101,8±13,7	71,6±26,0	109,3±19,3

([c]) Proteínas analisadas no citoplasma; ([m]) Proteínas analisadas na membrana.

9. Referências

1. Alonso SR, Otiz P, Pollán M, Pérez-Gomez B, Sánchez L, Acuña MJ, et al. Progression in cutaneous malignant melanoma is associated with distinct expressionprofiles: A tissue microarray-basedstudy. Am J Pathol 2004; 164(1):193-203.

2. Azevedo G, Mendonça S. Risco crescente de melanoma de pele no Brasil. Rev Saúde Pública S Paulo 1992; 26(4):290-4.

3. Balch CM, Buzaid AC, Soong SJ, et al. Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. J Clin Oncol 2001; 19(16):3635-48.

4. Baldi A, Santini D, De Luca A, Paggi MG. cDNA array technology in melanoma: An overview. J Cell Physiol 2003; 196:219-23.

5. Baldi A, Santini D, Russo P, et al. Analysis of APAF-1 expression in human cutaneous melanoma progression. Exp Dermatol 2006; 13(2):93-7.

6. Bar-Eli M. Molecular mechanisms of melanoma metastasis. J Cell Physiol 1997; 173:275-8.

7. Benett DC. Human melanocyte senescence and melanoma susceptibility genes. Oncogene 2003; 22:3063-9.

8. Breslow A, Macht SD. Optimal size of resection margin for thin cutaneous melanoma. Surg Gynecol Obstet 1977; 145:691-2.

9. Burton RC, Coates MS, Hersey P, et al. An analysis of a melanoma epidemic. Int J Cancer 1993; 55:765-70.

10. Bush JA, Li G. The role of Bcl-2 family members in the progression of cutaneous melanoma. Clin Exp Metastasis 2003; 20:531-9.

11. Carmichael VE, Wilson KS. Primary cutaneous malignant melanoma: Experience of British Columbia Cancer Agency from 1972 to 1981. CJS 1992; 35:589-97.

12. Clark Jr. WH, From L, Bernardino EA, Mihm MC. The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin. Canser Res 1969; 29:705-27.

13. Costache M, Simionescu O, Sajin M, Chefani A, Ene AM, Teodorov AM, et al. Apoptosis in cutaneous melanomas. Romanian J Morphol Embryol 2007; 48(4):343-7.

14. Criado PR, Vasconcelos C, Sittart JAS, et al. Melanoma maligno cutâneo primário: Estudo retrospectivo de 1963 a 1997 no Hospital do Servidor Público Estadual de São Paulo. Rev Ass Méd Brasil 1999; 45(2):157-62.

15. Dai DL, Martinka M, Bush JA, Li G. Reduced Apaf-1expression in cutaneous melanoma. Brit J Cancer 2004; 91:1089-95.

16. Dawson-Saunders B, Trapp RG. Basic and clinical biostatistics. Norwalk: Appleton & Lange; 1994.

17. Degterev A, Yuan J. Expansion and evolution of cell death programmes. Mol Cell Biol 2008; 9:378-89. [Reviews].

18. Demeret C, Garcia-Carranca A, Tierry F. Transcription-independent triggering of the extrinsic pathway of apoptosis by human papillomavirus 18 E2 protein. Oncogene 2003; 22(2):168-75.

19. Dennis LK. Analysis of the melanoma epidemic, both apparent and real: Data from the 1973 through 1994 surveillance, epidemiology, and end results program registry. Arch Dermatol 1999; 135:275-80.

20. Eberle J, Fecker LF, Hossini AM, et al. CD95/Fas overcomes the intrinsic apoptosis resistance of malignant melanoma and inhibits growth and progression of human melanoma xenotransplants. Oncogene 2003; 22:9131-41.

21. Elder DE, Guerry D, Heiberger RM, et al. Optimal resection margin for cutaneous malignant melanoma. Plast Reconstr Surg 1983; 71:66-72.

22. Espíndola MB, Corleta OC. Bcl-2 expression is not associated with survival in metastatic cutaneous melanoma: A historical cohor study. Worl J Surg Oncol 2008; 6:65-71.

23. Essner R. Surgical treatment of malignant melanoma. Surg Clin N Am 2003; 83:109-56.

24. Fayolle C, Pourchet J, Fromentel CC, Puisieux A, Doré J-F, Voeltzel T. Gadd45a activation protects melanoma cells from ultraviolet B-induced apoptosis. J Invest Deramtol 2008; 128:196-202.

25. Fecker LF, Geilen CC, Hossini AM, et al. Selective induction of apoptosis in melanoma cells by tyrosinase promote-controlled CD95 ligand overexpression. J Invest Dermatol 2005; 124:221-8.

26. Fecker LF, Geilen CC, Christoph C, et al. Loss of proapoptotic Bcl-2-related multidomain proteins in primary melanomas is associated with poor prognosis. J Invest Dermatol 2006; 126:1366-71.

27. Green A. Theory of site distribution of melanomas. Cancer Causes Control 1992; 3:513-6.

28. Green DR, Kroemer G. The pathophysiology of mitochondrial cell death. Science 2004; 305:626-9.

29. Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. Science 1998; 281:1309-12.

30. Grover R, Wilson GD. Bcl-2 expression in malignant melanoma and its prognostic significance. Eur J Surg Oncol 1996; 22:347-9.

31. Guimarães CA, Linden R. Programmed cell death, apoptosis and alternative death styles. Eur J Biochem 2004; 271:1638-50.

32. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. Nature 2000; 407:770-6.

33. Henry-Mowatt J, Dive C, Martinou JC, James D. Role of mitochondrial membrane permeabilization in apoptosis and cancer. Oncogene 2004; 23: 2850-60.

34. Hersey P. Apoptosis and melanoma: How new insights are effecting the development of new therapies for melanoma. Curr Opin Oncol 2006; 18:189-96.

35. Hes O, Michal M, Kuroda N, et al. Vimentin reactivity in renal oncocytoma: Himmunohistochemical study of 234 cases. Arch Pathol Lab Med 2007; 131:1782-8.

36. Holme SA, Malinovsky K, Roberts DL. Malignant melanoma in South Wales: Changing trends in presentation (1986-1998). Clin Exp Dermatol 2001; 26:484-9.

37. Hossini AM, Eberle J, Fecker LF, et al. Conditional expression of exogenous Bcl-X(S) triggers apoptosis in human melanoma cells in vitro and delays growth of melanoma xenografts. FEBS Lett 2003; 553:250-6.

38. Howe HL, Wingo PA, Thun MJ, et al. Annual report to the nation on the status of cancer (1973 through 198), featuring cancers with recent increasing trends. J Natl Cancer Inst 2001; 93:824-42.

39. INCA – Instituto Nacional de Câncer. Câncer de pele: Melanoma. Disponível em: www.inca.gov.br. Acesso em: 12 de agosto de 2008.

40. Jemal A, Devesa SS, Hartge P, Tucker MA. Recent trends in melanoma incidence among whites in the United States. J Natl Cancer Inst 2001; 93:678-83.

41. Kenehira K, Hu J, Pier T, Sebree L, Huang W. High endogenous avidin binding activity: An inexpensive and readly available marker for the differential diagnosis of kidney neoplasms. Int J Clin Exp Pathol 2998; 1:435-9.

42. Kuo TC, Hoon DSB, Takeuchi H, et al. Prediction of disease outcome in melanoma patients by molecular analysis of paraffin-embedded sentinel lymph nodes. J Clin Oncol 2003; 19:3566-72.

43. Landman G, Muller H, Neto JF, et al. Consenso para o laudo anatomopatológico do melanoma cutâneo. Acta Oncol Brasil 2003; 23(3):504-10.

44. Leiter U, Schmid RL, Kaskel P, Peter RA, Krän G. Antiapoptotic bcl-2 and bcl-xL in adavanced melanoma. Arch Dermatol Res 2000; 292:225-32.

45. Leverkus M, Gollnick H. “Bak (and Bax) to the future” of primary melanoma prognosis? J Invest Dermatol 2006; 126:1212-4.

46. Lima Jr CLH. Modulação de adesão e ciclo celular: Influência no desenvolvimento de micrometátases em linfonodo sentinela de melanoma cutâneo [Dissertação]. São Paulo: Fundação Antonio Prudente; 2006.

47. Liu T, Brouha B, Grossman D. Rapid induction of mitochondrial events and Caspase-independent apoptosis in Survivin-targeted melanoma cells. Oncogene 2004; 23:39-48.

48. MacKie R, Bray CA, Hole DJ, et al. Incidence of and survival from malignant melanoma in Scotland: An epidemiological study. Lancet 2002; 360:587-91.

49. MacKie R, Hole D, Hunter JA, et al. Cutaneous malignant melanoma in Scotland: Incidence, survival, and mortality, 1979-94. Br Med J 1997; 315:117-21.

50. MacLennan R, Green AC, McLeod GR, Martin NG. Increasing incidence of cutaneous melanoma in Queensland, Australia. J Natl Cancer Inst 1992; 84:1427-32.

51. Mansson-Brahme E, Johansson H, Larsson O, Rutqvist LE, Ringborg U. Trends in incidence of cutaneous malignant melanoma in a Swedish population 1976-1994. Acta Oncol 2002; 41:138-46.

52. Marrett LD, Nguyen HL, Armstrong BK. Recent trends in the incidence of malignant melanoma in New South Wales 1983-1996. Int J Cancer 2001; 92:457-62.

53. Mikhail M, Velasquez E, Shapiro R, Berman R, Pavlik A, Sorhaindo L, et al. PTEN expression in melanoma: Relatioship with patient survival, Bcl-2 expression, and proliferation. Clin Cancer Res 2005; 11:5153-7.

55. Nakagawa S, Shiraishi T, Kihara S, Tabuchi K. Detection of DNA strand breaks associated with apoptosis in human brain tumors. Virchows Res 1995; 427:175-9.

55. Niedojadio K, Labedzka K, Lada E, Milewska A, Chwirot BW. Apaf-1 expression in human cutaneous melanoma progression and in pigmented nevi. Pigment Cell Res 2008; 19(1):igment Cell Res 2008; 19(1):43-50.

56. Ohtsuka H, Nagamatsu S. Changing trends in numbers of deaths from Malignant Melanoma in Japan, 1955-2000. Dermatology 2003; 207:162-5.

57. Oppermann M, Geilen CC, Fecker LF, Gillissen B, Daniel PT, Eberle J. Caspase-independent induction of apoptosis in human melanoma cells by the proapoptotic Bcl-2-relatedprotein Nbk/Bik. Oncogene 2005; 24:7369-80.

58. Oumeish OU. Epidemiology of primary cutaneous malignant melanoma in Jordan. Intern J Dermatol 1995; 36:113-5.

59. Pedeux R, Sales F, Pourchet J, Kallassy M, Fayolle C, Boniol M, et al. Ultraviolet B sensitivity of peripheral lymphocytes as an independent risk factor for cutaneous melanoma. Eur J Cancer 2006; 42(2):212-5.

60. Redondo P, Solano T, Vázquez B, Bauza A, Idoate M. Fas and Fas ligand: Expression and soluble circulating levels in cutaneous malignant melanoma. Br J Dermatol 2002; 147(1):80-6.

61. Sá BCS. Criação de *tissue array* de melanomas cutâneos extensivos superficiais para estudo imuno-histoquímico de fatores ligados à proliferação e apoptose celular [Dissertação]. São Paulo: Fundação Antonio Prudente; 2005.

62. Sá BCS, Fugimori ML, Ribeiro KCB, Duprat Neto JP, Neves RI, Landman G. Proteins involved in pRb and p53 pathways are differentially expressed in thin and thick superficial spreading melanomas. Melanoma Res 2008; (in press).

63. Schön MP, Wienrich BG, Drewniok C, Bong AB, Eberle J, Geilen CC, et al. Death receptor-independent apoptosis in malignant melanoma induced by

the small-molecule immune response modifier imiquimod. J Invest Dermatol 2004; 122:1266-76.

64. Sekulik A, Haluska Jr. P, Miller AJ, De Lamo JG, Ejadi S, Pulido JS, et al. Malignant melanoma in the 21st century: The emerging molecular landscape. Mayo Clin Proc 2008; 83(7):825-46.

65. Shukuwa T, Katayama I, Koji T. Fas-mediated apoptosis of melanoma cells and infiltrating lymphocytes in human malignant melanomas. Modern Pathol 2002; 15(4):387-96.

66. Soengas MS, Lowe SW. Apoptosis and melanoma chemoresistance. Oncogene 2003; 22:3138

67. Soengas MS, Capodieci P, Polsky D, et al. Inactivation of the apoptosis effector APAF-1 in malignant melanoma. Nature 2001; 409:207-11.

68. Srivastana M, Ahmad N, Gupta S, Muktar H. Involvement of Bcl-2 and Bax in photodynamic therapy-mediated apoptosis. J Biol Chem 2001; 276(18): 15481-8.

69. Stadelman JS, Rapport DP, Soong S-J, Reintgen DS, Buzaid AC, Balch CM. Prognostic clinical pathologic features. In: Cutaneous melanoma. 3rd ed. St. Louis: Quality Medical Publishing, Inc.; 1998.

70. Tang L, Tron VA, Reed JC, Mah KJ, Krajewska M, Li G, et al. Expression of apoptosis regulators in cutaneous malignant melanoma. Clin Cancer Res 1998; 4:1865-71.

71. Tchernev G, Orfanos CE. Downregulation of cell cycle modulators p21, p53, Rb and proapoptotic Bcl-2-related protein Bax and Bak in cutaneous melanoma associated with worse patient prognosis: Preliminary findings. J Cutaneous Pathol 2007; 34(3):247-56.

72. Tomatis L. Cancer: Causes, occurrence and control. Lyon: IARC, 1990. [IARC Scientific Publication, 100].

73. Tron VA, Krajewski S, Klein-Parker H, Li G, Ho VC, Reed JC. Immuno-histo-chemical analysis of Bcl-2 protein regularion in cutaneous melanoma. Am J Pathol 1995; 146(3):643-9

74. Utikal J, Leiter U, Udart M, Kaskel P, Peter RU, Krähn GM. Expression of c-myc and bcl-2 in primary and advanced cutaneous melanoma. Cancer Invest 2002; 20(7):914-21.

75. Vieira H, Kroemer G. Mitochondria as targets of apoptosis regulation by nitric oxide. IUBMB Life 2003; 55(10-11):613-6.

76. Wainstein AJA, Belfort FA. Conduta para o melanoma cutâneo. Ver Col Bras Cir 2004; 31(3):204-14.

77. Waterhouse J. Cancer incidence in five continents. Lyon: IARC, 1987. [IARC Scientific Publication, 88].

78. Welch DR, Goldberg SF. Molecular mechanisms controlling human melanoma progression and metastasis. Pathobiology 1997; 65:311-30.

79. Zhang H, Rosdahl I. Bcl-xL and Bcl-2 proteins in melanoma progression and UVB-induced apoptosis. Int J Oncol 2006; 28:661-6.