

**ESTUDO DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS
INIBIDORAS DE APOPTOSES EM MELANOMAS
PRIMÁRIOS COM E SEM MICROMETÁSTASES
EM LINFONODO SENTINELA**

MICHELLE MELO CORRÊA DE OLIVEIRA

**Dissertação apresentada à Fundação Antônio
Prudente para obtenção do Título de Mestre
em Ciências**

Área de Concentração: Oncologia

Orientador: Dr. Rafael Malagoli Rocha

São Paulo

2012

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Oliveira, Michelle Melo Corrêa de

Estudo da expressão de proteínas inibidoras de apoptoses em melanomas primários com ou sem micrometástases em linfonodo sentinela / Michelle Melo Corrêa de Oliveira – São Paulo, 2012.

68p.

Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração:

Oncologia.

Orientador: Rafael Malagoli Rocha

Descritores: 1. MELANOMAS. 2. APOPTOSE. 3. SMAC/Diablo 4. IAP
5. XIAP. 6. SURVIVINA.

Dedico este trabalho a quem é
o principal alvo da Medicina: o paciente.

E, em especial, àqueles que foram acometidos
por essa doença tão intrigante que é o Melanoma,
alvo da minha pesquisa e de outros profissionais da área,
que buscam contribuir para melhorar a resposta terapêutica e,
consequentemente, a qualidade de vida desses pacientes.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. João Pereira Duprat Neto, Diretor do Departamento de Oncologia Cutânea do Hospital A. C. Camargo, pela oportunidade de realizar este projeto.

Ao Dr. Rafael Malagoli Rocha, por ter aceitado dar continuidade a este projeto, a despeito de todas as adversidades, e, assim, permitir a sua concretização.

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

Ao Dr. Gilles Landman e ao Dr. José Vassalo, pela colaboração na revisão anátomo-patológica das amostras e na padronização da marcação dos anticorpos.

À minha amiga e copesquisadora Aline Sayuri: lado a lado e dia a dia, vivenciamos, juntas, adversidades e alegrias.

Às equipes do SAME, da Biblioteca, da Estatística e da Pós-graduação do Hospital A. C. Camargo, cujas competências foram indispensáveis a todo este processo.

A Silvana Santos, Editora Científica, pela revisão do texto em que resultaram nossas investigações.

À minha família: pai, mãe e Nelly, que são o meu porto seguro e que, mesmo longe, vivenciaram tudo comigo.

Ao meu noivo, Rafael, companheiro de todas as horas, que viveu e sofreu junto comigo, e que ajudou no que pôde.

RESUMO

Oliveira MMC. **Estudo da expressão de proteínas inibidoras de apoptoses em melanomas primários com ou sem micrometástases em linfonodo sentinela.** São Paulo; 2012. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

O fato de o melanoma ser uma doença com comportamento clínico muito peculiar a cada paciente, a despeito dos aspectos clínicos e epidemiológico já bem estabelecidos e, por nem sempre essas variáveis serem suficientes para prever com acurácia o prognóstico específico, justifica-se este trabalho, onde foi avaliada a expressão das proteínas inibidoras de apoptose c-IAP2, XIAP, Survivina e Smac/Diablo em amostras de melanomas primários com espessura igual ou maior que 1 mm, com e sem micrometástases em linfonodo sentinela, recuperadas em prontuários de 63 pacientes tratados no período de 1997 a 2007 cujas informações atendiam aos critérios de inclusão para esta investigação. Após a devida revisão das lâminas e blocos para confirmação diagnóstica e para estabelecimento dos parâmetros prognósticos, as áreas representativas dos tumores foram cuidadosamente selecionadas em lâminas coradas por HE, e os blocos com tecido tumoral foram utilizados para a construção de *tissue microarrays* (TMAs). Os resultados foram classificados em positivos ou negativos, de acordo com a intensidade da reação e porcentagem do tumor acometido. Esses achados foram correlacionados com a sobrevida câncer-específica e livre da doença em cinco anos. Os aspectos epidemiológicos, clínicos e histológicos desses melanomas cutâneos são apresentados descritivamente. Foi observada expressão positiva de XIAP em 93,9% das amostras; de Smac/Diablo em 84,6%; de c-IAP-2 em 72,1%; e de Survivina em 23,4% das amostras. Não houve associação significativa entre a expressão dessas proteínas e a sobrevida câncer-específica e livre da doença dos pacientes em cinco anos.

SUMMARY

Oliveira MMC. [**Expression of inhibitor of apoptosis proteins in primary melanomas with and without sentinel lymph nodes micro metastasis**]. São Paulo; 2012. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Expression of inhibitor of apoptosis protein c-IAP2, XIAP, Survivin, and Smac/Diablo was assessed in samples of ≥ 1 mm primary melanomas with or without sentinel lymph nodes micro metastasis collected from the files of 63 patients treated along 1997 to 2007 whose information was in accordance with the inclusion criteria adopted for this investigation. After due revision of slides and blocks for confirming diagnosis and establishing prognostic parameters, representative tumor areas were carefully selected in slides stained by HE, and tissue microarrays (TMAs) were constructed using the blocks with tumor tissue. Two fragments of each sample from different tumor areas were deposited in the receptor block, and slides were read in optical microscopy by the same pathologist. Positive or negative results were classified according the intensity of the reaction. Such findings were correlated with cancer-specific and disease-free survival in five years. Epidemiologic, clinical, and histological findings are described. XIAP was positive in 93.9%, Smac/Diablo in 84.6%, c-IAP-2 in 72.1%, and Survivin in 23.4% of the specimens. There were no significant associations between the expression of the studied inhibitor of apoptosis proteins and cancer-specific or disease-free survival in five years.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Amostra negativa para c-IAP-2.....	43
Figura 2	Amostra positiva para c-IAP-2.....	43
Figura 3	Amostra negativa para XIAP.....	43
Figura 4	Amostra positiva para XIAP.....	43
Figura 5	Amostra negativa para Survivina.....	44
Figura 6	Amostra positiva para Survivina.....	44
Figura 7	Amostra negativa para Smac/Diablo.....	45
Figura 8	Amostra positiva para Smac/Diablo.....	45
Figura 9	Distribuição das frequências absolutas relativas às amostras negativas e positivas observadas no estudo imuno-histoquímico das proteínas inibidoras de apoptose c-IAP-2, XIAP (citoplasmática), Survivina e Smac/Diablo.....	47
Figura 10	Curvas de sobrevida câncer-específica e de sobrevida livre da doença em cinco anos, conforme expressão positiva ou negativa de c-IAP-2.....	49
Figura 11	Curvas de sobrevida câncer-específica e de sobrevida livre da doença em cinco anos, conforme expressão positiva ou negativa de Survivina.....	50
Figura 12	Curvas de sobrevida câncer-específica e de sobrevida livre da doença em cinco anos, conforme expressão positiva ou negativa de Smac/Diablo.....	50

LISTA DE TABELAS E QUADRO

Tabela 1	Distribuição das frequências relativas aos achados clínico-demográficos em amostra de 63 pacientes com melanoma de espessura igual ou maior que 1,0 mm.....	37
Tabela 2	Distribuição das frequências relativas à localização dos tumores primários em amostra de 63 pacientes com melanoma de espessura igual ou maior que 1,0 mm.....	38
Tabela 3	Distribuição das frequências relativas aos achados histopatológicos em amostra de 63 pacientes com melanoma de espessura igual ou maior que 1,0 mm.....	40
Tabela 4	Distribuição das frequências relativas à localização de recidivas em 21 dentre 63 pacientes com melanoma de espessura igual ou maior que 1,0 mm.....	41
Tabela 5	Distribuição das frequências relativas aos escores finais observados no estudo imuno-histoquímico das proteínas inibidoras de apoptose c-IAP-2, XIAP (citoplasmática), Survivina e Smac/Diablo.....	45
Tabela 6	Risco relativo (RR) de sobrevida câncer-específica em casos de melanoma primário com espessura igual ou maior que 1 mm em relação à expressão das proteínas inibidoras de apoptose c-IAP-2, Survivina e Smac/Diablo.....	47
Tabela 7	Taxas de sobrevida câncer-específica e de sobrevida livre da doença em cinco anos, conforme expressão positiva ou negativa das proteínas inibidoras de apoptose c-IAP-2, Survivina e Smac/Diablo, em amostra de pacientes com melanoma primário com espessura igual ou maior que 1 mm.....	47
Quadro 1	Tipo de informações coletadas de prontuários médicos de 63 pacientes com melanoma primário com espessura > 1 mm para preenchimento de protocolo de estudo.....	30

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	5
2.1	Melanoma.....	5
2.1.1	Incidência	6
2.1.2	Fatores de risco.....	7
2.1.3	Classificação	9
2.1.4	Características clínico-histológicas e prognóstico	11
2.1.5	Diagnóstico e tratamento.....	13
2.1.6	Prevenção	16
2.2	Equilíbrio entre proliferação e morte celular	16
2.3	Proteínas inibidoras de apoptose (IAPS).....	19
2.3.1	XIAP	21
2.3.2	Survivina.....	22
2.3.3	Smac/Diablo	24
3	OBJETIVOS	27
3.1	Objetivo geral	27
3.2	Objetivos específicos.....	27
4	MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1	Casuística.....	28
4.2	Materiais e métodos	29
4.2.1	Protocolo de estudo.....	29
4.2.2	Coleta de lâminas e blocos.....	31
4.2.3	Confecção do TMA.....	31
4.2.4	Imuno-histoquímica (IHQ).....	32
4.3	Análise estatística.....	36

5	RESULTADOS	37
5.1	Achados clínico-demográficos.....	37
5.2	Localização dos tumores.....	38
5.3	Achados histopatológicos.....	38
5.4	Achados de disseminação tumoral.....	40
5.5	Achados relativos à evolução dos pacientes.....	41
5.6	Colorações imuno-histoquímicas.....	42
5.6.1	Achados imuno-histoquímicos.....	45
5.7	Influência dos achados imuno-histoquímicos na sobrevida dos pacientes.....	46
6	DISCUSSÃO	50
7	CONCLUSÃO	60
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA	61

ANEXOS

- Anexo 1** Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.
- Anexo 2** Dados clínico-demográficos de 63 pacientes com melanomas primários com espessura igual ou maior que 1 mm.
- Anexo 3** Dados histológicos de tecido tumoral de 63 pacientes com melanomas primários com espessura igual ou maior que 1 mm (parte 1).
- Anexo 4** Dados histológicos de tecido tumoral de 63 pacientes com melanomas primários com espessura igual ou maior que 1 mm (parte 2).
- Anexo 5** Dados de disseminação tumoral de 63 pacientes com melanomas primários com espessura igual ou maior que 1 mm.
- Anexo 6** Dados da evolução de 63 pacientes com melanomas primários com espessura igual ou maior que 1 mm.
- Anexo 7** Dados do estudo da expressão de proteínas inibidoras de apoptose em melanomas com espessura igual ou maior que 1 mm.

1 INTRODUÇÃO

O melanoma é um tumor resultante de transformação maligna e proliferação dos melanócitos, os quais são derivados do tecido neuroectodérmico e estão presentes na camada basal da epiderme (COSTACHE et al. 2007). Desenvolve-se em três diferentes estágios, que vão do radial para a fase de crescimento vertical e doença metastática (ALONSO et al. 2004).

De todos os tumores de pele, apenas 3% correspondem ao melanoma (FERRARI JÚNIOR et al. 2008), embora sua incidência tenha duplicado nas últimas décadas, com aumento muito maior do que em outros tipos de câncer (GOODSON e GROSSMAN 2009). Nos Estados Unidos da América, é o sexto tipo de câncer mais maligno e corresponde a 4% de todas as mortes por câncer (RIKER et al. 2010). No Brasil, segundo dados do Instituto Nacional do Câncer, representa 4% das neoplasias malignas da pele, apesar de ser a mais grave devido à sua alta possibilidade de metástase.

Varáveis clínicas e histológicas são usadas como fatores prognósticos no melanoma, como o Índice de Breslow, Clark, número de tumores, presença de ulceração e invasão vascular (ALONSO et al. 2004). A espessura do tumor é o fator prognóstico mais importante na determinação do risco de metástases. Nos casos de melanoma cutâneo com espessura de até 1,0 mm, a excisão local ampla é o tratamento apropriado e adequado, resultando em taxa de sobrevivência de cinco anos de 90%. Porém, há um subconjunto de pacientes com melanoma fino ($\leq 1,0$ mm) que desenvolvem metás-

tases, o que institui um desafio para a medicina atual (KALADI et al. 2003). Pacientes com metástases à distância apresentam sobrevida de aproximadamente dois anos (BALCH et al. 2009).

A presença de metástases em linfonodos também é fator prognóstico importante. Embora o comprometimento linfonodal seja mais provável em lesões maiores, ocorrendo em 20% dos pacientes cujos tumores apresentam espessura de 1 mm a 4 mm, a pesquisa do linfonodo sentinela (primeiro linfonodo a receber drenagem na cadeia linfática) já é padrão mesmo para os melanomas menores que apresentem outras características associadas, como Clark > III ou ulceração, pois permite avaliar o estado de toda a cadeia linfática (LAGES et al. 2011).

Por outro lado, o avanço extraordinário dos estudos de biologia molecular em melanoma na última década vem colaborando para o entendimento mais amplo desse tipo de tumor, o que deve influenciar no diagnóstico, na classificação, no prognóstico e no tratamento da doença. Nesse sentido, dentre outras alterações moleculares alhures descritas, defeitos na regulação da via da apoptose vêm sendo associados com a progressão do melanoma, sua disseminação e sua resistência a quimioterápicos (HUSSEIN et al. 2003; HERSEY 2006).

A apoptose é caracterizada por uma cascata proteolítica que envolve uma série de cisteína-proteases conhecidas como caspases, as quais culminam com a clivagem de substratos específicos. Atualmente, são conhecidas duas cascatas de ativação das caspases que regulam a apoptose: uma é descrita como receptor-mediada e a outra, como dependente de mitocôndria

(HUSSEIN et al. 2003).

A apoptose também é regulada por outra família de proteínas: as I-APs, ou Proteínas Inibidoras de Apoptose), que incluem as IAPs 1 e 2, a XI-AP, a Survivina e a ML-IAP que, de modo geral., inibem a ativação e a função efetora das caspases na apoptose. A sua ligação às IAPs é competitivamente inibida pelas proteínas Smac/Diablo e OMI que, liberadas pelas mitocôndrias, permite que as caspases atuem como indutoras de apoptose, e esse parece ser o principal mecanismo de indução de apoptose em melanoma (HERSEY 2006).

A despeito de os aspectos clínicos e epidemiológicos já estarem bem estabelecidos, o fato de o melanoma ser uma doença com comportamento clínico muito peculiar a cada paciente, e nem sempre essas variáveis serem suficientes para prever com acurácia o prognóstico específico de cada caso (COSTACHE et al. 2007), justifica estudos que contribuam com mais subsídios sobre o perfil clínico e epidemiológico dos pacientes com melanoma primário com e sem micrometástases em linfonodo sentinela.

Segundo ANGER (2008), porém, o perfil imuno-histoquímico de proteínas pró-apoptóticas em melanomas maiores e menores que 1mm comparado ao dos nevos melanocíticos usuais parece não ter significado prognóstico, o que pode estar indicando que outros fatores seriam necessários para sobrepujar a morte celular (apoptose) e contribuir para o crescimento e a disseminação dos melanomas.

Com base nessas informações, propusemo-nos a avaliar a expressão das proteínas inibidoras de apoptose c-IAP2, XIAP, Survivina e Smac/Diablo

em melanomas primários com espessura igual ou maior que 1 mm, com ou sem micrometástases em linfonodo sentinela, e correlacioná-la com a evolução dos pacientes.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 MELANOMA

O melanoma cutâneo é um tumor resultante de transformação maligna e proliferação dos melanócitos (COSTACHE et al. 2007) que se originam da crista neural e estão localizados na camada basal da epiderme, cabelos, bulbo, olhos, orelhas e meninges (BANDARCHI et al. 2010).

As principais funções dessas células são a síntese e a transferência dos grânulos de melanina para os queratinócitos que, assim, formam uma espécie de escudo de proteção do DNA celular capaz de absorver a radiação UV (ultravioleta) e neutralizar os radicais livres produzidos pela ação antioxidante. Paradoxalmente, os melanócitos são danificados e transformados pelos mesmos agentes programados para protegê-los de radiação UV (MARKOVIC et al. 2007).

A cor da pele é particularmente determinada pelos tipos de grânulos de melanina, que são a eumelanina (pigmento preto ou marrom), a feomelanina (pigmento amarelo ou vermelho) e a mistura de ambas, bem como pelo número, pelo tamanho e pela densidade dos melanossomos (SOUZA et al. 2004; MARKOVIC et al. 2007).

O melanoma desenvolve-se em três diferentes estágios que vão do radial para a fase de crescimento vertical e doença metastática (ALONSO et al. 2004). A fase de crescimento radial é aquela em que o tumor se encontra

restrito à epiderme, sem evidência de mitoses, apenas com aumento no diâmetro da lesão. Na fase vertical., o tumor já se encontra na derme, com evidência de mitoses e presença de células tumorais com atividade proliferativa (CUMMINS et al. 2006; PAYETTE et al. 2009).

2.1.1 Incidência

De todos os tumores de pele, o melanoma corresponde a apenas 3%, mas com morbidade importante e alta taxa de mortalidade, respondendo por 75% de todas as mortes por neoplasia cutânea maligna (FERRARI JÚNIOR et al. 2008) e por 4% de todas as mortes por câncer nos Estados Unidos da América (RIKER et al. 2010).

No Brasil, o câncer de pele é o tipo de câncer mais frequente, e corresponde a 25% de todos os tumores malignos registrados no país. O melanoma representa apenas 4% das neoplasias malignas cutâneas, mas é a mais grave delas devido à alta incidência de metástases. Segundo dados do Instituto Nacional do Câncer - INCA, estima-se, no Brasil, cerca de 2.960 homens e 2.970 mulheres (5.930 casos) acometidos por essa neoplasia em 2010, embora a literatura internacional reporte que a incidência de melanoma tende a ser maior em homens (TUCKER 2009; RIKER et al. 2010; BANDARCHI et al. 2010).

O aumento da incidência de melanoma que se observa em todo o mundo é parcialmente devido à detecção precoce (melanomas finos); mas há também um aumento real nessa incidência devido tanto à maior exposição ao sol e a outras fontes de radiação ultravioleta (UVR) quanto às modifi-

cações na camada de ozônio que fazem com que a luz solar alcance a superfície terrestre com intensidade muito maior (CUMMINS et al. 2006).

O prognóstico, por sua vez, vem tendendo a melhorar justamente em decorrência do diagnóstico precoce de melanomas finos e, portanto, em uma fase curável da doença (TUCKER 2009; BANDARCHI et al. 2010).

O melanoma atinge tanto indivíduos jovens quanto adultos mais velhos. De maneira geral, é mais frequente em homens do que em mulheres, exceto em locais em que se tem o hábito de exposição solar intensa, como em algumas regiões da Europa e dos Estados Unidos, onde a incidência em mulheres tende a ser maior (MACKIE et al. 2009; RIKER et al. 2010). A ocorrência de melanoma tende a ter um aumento linear a partir dos 15 até os 50 anos, com uma média em torno dos 57 anos para o diagnóstico e ao redor dos 67 anos para óbito (MARKOVIC et al. 2007).

As áreas corporais mais vulneráveis à ocorrência de melanoma são o tronco (43,5%), as extremidades (33,9%), acral (11,9%), e a região de cabeça e pescoço (10,9%) (BANDARCHI et al. 2010). Tanto negros quanto brancos norte-americanos apresentam a mesma chance de desenvolver melanoma acral. No entanto, melanomas não cutâneos são mais comuns em não brancos (MARKOVIC et al. 2007).

2.1.2 Fatores de risco

Os principais fatores de risco para a ocorrência dessa neoplasia são a exposição ao sol, a cor da pele branca, o desenvolvimento de mais de 50 nevos, a presença de cinco nevos atípicos ou de nevos congênitos com mais

de 6 mm de largura, PUVA-terapia, história de quimioterapia, xeroderma pigmentoso, imunossupressão, antecedentes familiares e fatores genético (CUMMINS et al. 2006; MARKOVIC et al. 2007; HAACK et al. 2008; TUCKER 2009; GOODSON e GROSSMAN 2009)

A UVR é o principal fator de risco envolvido no desenvolvimento do melanoma cutâneo primário e, dentro do espectro magnético da luz, pode ser dividida em UVB (320 nm – 280 nm), que há muito tempo já vem sendo relacionada com tumores de pele tanto benignos quanto malignos pelo dano que causa em material genético (FAYOLLE et al. 2008); UVA (400 nm – 320 nm), que promove fotoenvelhecimento e, embora já tenha sido considerada mais segura em anos passados, também pode ser causa de neoplasia maligna cutânea; e UVC (280 nm – 100 nm), que é bloqueada pela camada de ozônio e relacionada com menor ocorrência de câncer (CUMMINS et al. 2006). A lesão melanocítica por UVR depende, preferencialmente, do tipo de radiação incidente, da cor da pele (fototipo), da espessura da camada de ozônio e da quantidade de nuvens no local da exposição ao sol (MARKOVIC et al. 2007).

Estudos moleculares têm demonstrado o poder da UVB em promover mutações no DNA que podem interferir na apoptose pela ativação tanto da via mitocondrial quanto das vias caspase-independente (FAYOLLE et al. 2008) e p-53-independente (RAJ et al. 2008). Alterações nos mecanismos apoptóticos, por sua vez, podem tanto induzir desequilíbrio na morte celular quanto ativar os inibidores da apoptose, promovendo maior proliferação celular e, conseqüentemente, a progressão do melanoma (RAJ et al. 2008).

A história familiar é outro fator importante no surgimento do melanoma, pois pacientes com parentes de primeiro grau com história de melanoma têm risco de desenvolver a doença duas vezes maior do que os indivíduos sem antecedentes familiares (MARKOVIC et al. 2007; GOODSON e GROSSMAN 2009). Grupos internacionais de pesquisadores voltados para o estudo de genética em melanoma, como o GenoMel e o Gem, identificaram tanto os genes quanto as mutações importantes que ocorrem nesses genes que controlam o ciclo celular. Mostraram que um terço dos casos de melanoma invasivo com antecedentes familiares do tumor apresentou mutações no gene CDKN2A, o que foi especialmente observado em áreas geográficas específicas, como Mediterrâneo, Suécia e Escócia, e que esses casos estavam relacionados com a Síndrome dos Nevos Atípicos. Os genes CDK4 e MC1R, atuando tanto isoladamente quanto na presença de CDKN2A, também já foram relacionados a melanomas familiares (MACKIE et al. 2009; KUDCHADKAR 2010). Antecedentes familiares de câncer de pâncreas e de astrocitoma também fazem parte da investigação dessa neoplasia (MARKOVIC et al. 2007).

2.1.3 Classificação

O melanoma foi classificado por CLARK et al. (1969) em tipo extensivo superficial, lentigo maligno e nodular. Posteriormente, REED (1976) acrescentou um quarto tipo chamado de melanoma maligno acral lentiginoso. Atualmente é classificado em Melanoma Extensivo Superficial (com incidência de 50%-75%), Melanoma Nodular (15%-35%), Lentigo Maligno (5%-

15%), Melanoma Acral Lentiginoso (5%-10%) e Melanoma Desmoplásico, que é pouco frequente (BANDARCHI et al. 2010; SÁNCHEZ-YUS et al. 2010).

O Melanoma Extensivo Superficial (MES) é o tipo mais comum de melanoma, pode ocorrer em qualquer local e em qualquer idade, e está associado com exposição intermitente ao sol. Cerca de 75% dos MESs podem recidivar. De maneira geral., as lesões se apresentam clinicamente com variação na pigmentação e distribuição de células pagetoides ao longo da epiderme (PAYETTE et al. 2009; SCOLYER et al. 2011).

O Melanoma Nodular (MN) tem demonstrado taxa de crescimento mais rápida, comportamento biologicamente mais agressivo e com número maior de mitoses quando comparado com os outros subtipos. Ele também parece carecer de uma fase inicial de crescimento radial, pois já surge com crescimento vertical., fator possivelmente decorrente da natureza das células tumorais e/ou de várias influências microambientais. Quando apresenta células amelanóticas, pode ser confundido com carcinoma basocelular (KALKHORAN et al. 2010; SCOLYER et al. 2011).

O Lentigo Maligno (LM) ocorre na pele exposta ao sol continuamente, como face e extremidades superiores de pacientes idosos. Inicialmente denominado de sardas de Hutchinson, é caracterizado por proliferação contínua intraepitelial de células neoplásicas com formação de ninhos que se estendem aos anexos cutâneos. A epiderme é atrófica, e há elastose. Apenas 5% dos pacientes com LM progridem para melanoma, usualmente após vários anos (BANDARCHI et al. 2010; SCOLYER et al. 2011).

O Melanoma Acral Lentiginoso (MLA) corresponde a 2%-8% dos melanomas em pacientes de pele clara, mas é o tipo mais frequente em pessoas de pele escura e asiáticos (corresponde a 35%-60% dos melanomas nesse grupo populacional). Ocorre nas palmas das mãos, na planta dos pés e sob as unhas. É o subtipo mais agressivo dos melanomas (CASCINELLI et al. 1994; CRESS e HOLLY 1997; BRANDÃO et al. 2005). Em sua fase intraepidérmica, há pigmentação irregular e pobremente circunscrita; o desenvolvimento de área nodular reflete o padrão invasivo de crescimento (GARBE et al. 2011).

2.1.4 Características clínico-histológicas e prognóstico

As características clínico-histológicas estão relacionadas com o Índice de Breslow, presença de ulceração, número de mitoses, nível de Clark, presença de infiltração tumoral de linfócitos, regressão, satelitoses microscópicas, invasão linfovascular, angiotropismo, volume tumoral., neurotropismo, tipo celular, recorrência local., subtipos histopatológicos e fase de crescimento vertical (BALCH et al. 2009; BANDARCHI et al. 2010; SCOLYER et al. 2011).

O Índice de Breslow é o fator clínico-patológico mais amplamente utilizado para individualizar o tratamento cirúrgico (BRESLOW 1970). Melanomas com estágio clínico I (melanoma primário com espessura de até 1 mm) estão associados a taxas muito baixas de metástases à distância e de morte por melanoma e a taxas baixas de metástase local ou reincidência regional. Melanomas com espessura de até 0,76 mm apresentam baixo risco para recidivas ou metástases (PAYETTE et al. 2009).

Em CLARK et al. (1969) definiram cinco níveis de invasão tumoral nas camadas da pele, a saber:

- Nível 1 - Restrito à epiderme
- Nível 2 - Estendendo-se até a derme papilar
- Nível 3 - Estendendo-se até a interface entre a derme papilar e a reticular;
- Nível 4 - Estendendo-se até a derme reticular.
- Nível 5 - Com acometimento do tecido subcutâneo.

Esses autores correlacionaram a invasão do tumor com o prognóstico, e mostraram que a taxa de sobrevivência é inversamente proporcional à invasão tumoral: pacientes com melanomas classificados no nível 3 de Clark têm risco de morte pelo melanoma de 3,7 vezes maior do que aqueles classificados em níveis inferiores; esse risco é de 16 vezes maior em pacientes com melanomas classificados no nível 4. Esses achados foram similares quanto à idade e ao sexo dos pacientes, à localização do tumor e à presença de ulceração (CLARK et al. 1969).

Há casos em que se pode observar a regressão do melanoma, que é histologicamente definida como resultado da interação entre as células tumorais e o sistema imune, que promove a substituição do tecido tumoral por tecido fibrótico por ação dos melanófagos, proliferação linfocitária e telangiectasias. Em áreas de completa regressão, muitas vezes as células tumorais se encontram totalmente ausentes. No entanto, a presença de regressão pode piorar a sobrevivência, mesmo nos casos de melanomas finos (PAYETTE et al. 2009).

Nódulos satélites, ou satelitoses, são definidos como quaisquer ninhos descontínuos de células metastáticas intralinfáticas com diâmetro menor que 0,05 mm que estejam claramente separadas, pela pele normal (e não por fibrose ou inflamações), do principal componente invasivo do melanoma em distância de pelo menos 0,3 mm (BALCH 2009). Considera-se, então, metástase em trânsito o foco tumoral intralinfático que se encontra a uma distância de 5 cm ou mais do tumor primário, mas sem alcançar ainda os linfonodos regionais. A presença tanto de nódulos satélites quanto de metástases em trânsito implicam em pior prognóstico (GARBE et al. 2011).

Também deve ser observada eventual presença de infiltração nervosa por células tumorais, pois alguns tipos de melanoma, como o desmoplásico ou os melanomas de células fusiformes, têm alta propensão para invasão perineural (IVAN e PRIETO 2010).

2.1.5 Diagnóstico e tratamento

Diagnóstico clínico mais precoce seguido de tratamento adequado ao tipo histológico do melanoma está associado com taxas mais altas de sobrevida. Nesse contexto, a dermatoscopia desempenha papel fundamental, pois permite a identificação de lesões suspeitas a partir de características morfológicas não visíveis a olho nu, o que possibilita a excisão dessas lesões com margem mínima de segurança de 1 mm a 2 mm e ampliação cirúrgica das margens de acordo com o tipo histológico (KUO et al. 2003; GOODSON e GROSSMAN 2009).

Existe uma variedade de protocolos de ampliação de margens do melanoma primário cutâneo (TSAO et al. 2004; BANDARCHI et al. 2010).

Em alguns casos, quando o diagnóstico histológico é duvidoso, o emprego de técnicas imuno-histoquímicas é fundamental. No caso da melanina, a avaliação das proteínas S-100, HMB45 e Melan-A pode confirmar a presença de lesões tumorais em células melanocíticas, além de fornecer informações adicionais que podem influenciar no tratamento e no prognóstico (GARBE et al. 2011).

Na avaliação diagnóstica dos melanomas, a biópsia do linfonodo sentinela é atualmente considerada rotina dentro da maioria dos grandes centros, e é essencial para o estadiamento do tumor na classificação *American Joint Committee on Cancer (AJCC)* desde 2001 (BALCH et al. 2009). Para a avaliação de metástase linfonodal, a revisão do sistema de estadiamento do AJCC realizada em 2009 recomenda o uso de técnicas de coloração de hematoxilina-eosina (HE), assim como de técnicas imuno-histoquímicas com uso preferencial dos anticorpos S100 β , Melan A e HMB-45 (BALCH et al. 2009).

Para a avaliação de metástases linfonodais, os parâmetros a serem considerados devem incluir a profundidade da invasão a partir da cápsula, o diâmetro máximo e a localização do linfonodo dentro da cadeia linfática (WA-INSTEIN e BELFORT 2004). Cerca de dois terços dessas metástases são confinados ao linfonodo regional, e podem se manifestar como:

- Micrometástases, que não são diagnosticadas clinicamente ou por exames de imagem, mas apenas por análises imuno-histoquímicas ou

por técnicas de PCR.

- Metástases satélites, em que os nódulos intralinfáticos são observados em distância maior que 2 cm do tumor primário.
- Metástases em trânsito, localizadas em distância de 2 cm entre o tumor primário e o primeiro linfonodo.
- Metástases linfonodais diagnosticadas clinicamente.

Os principais órgãos acometidos por metástase à distância de melanomas são o fígado, o pulmão e o cérebro (GARBE et al. 2011), e a investigação desses órgãos deve fazer parte da rotina de diagnóstico e acompanhamento de casos de melanoma.

Excisão cirúrgica, radioterapia e terapia com interferon têm sido utilizadas tanto no tratamento do tumor quanto no tratamento de metástases. Perfusão isolada de membro hipotérmico com melphalan é a indicação para os casos de várias lesões cutâneas em um mesmo segmento (GONZALEZ et al. 2010).

O seguimento ambulatorial desses pacientes costuma ser feito com testes laboratoriais de rotina, como a análise de lactato desidrogenase (LDH), e/ou com exames de imagem, como a tomografia computadorizada, a ressonância magnética e PET scan (BANDARCHI et al. 2010). Nos estádios mais avançados da doença, como o estágio IV, a elevação da LDH é fator preditor independente altamente significativo de sobrevida (BALCH et al. 2009).

2.1.6 Prevenção

Para a prevenção dos melanomas primários, deve-se evitar exposição inadequada ou constante ao sol e fazer uso correto e frequente dos fotoprotetores. Em pacientes de risco, a avaliação dermatológica e exames dermatoscópicos de rotina são medidas preventivas importantes (HAACK et al. 2008; TUCKER 2009).

Para prevenção de recidivas, ressalta-se o cuidado com as margens de segurança cirúrgica (GOODSON e GROSSMAN 2009).

2.2 EQUILÍBRIO ENTRE PROLIFERAÇÃO E MORTE CELULAR

Tão importante quanto a divisão e a proliferação celular, a morte celular programada permite que o organismo controle o número de células, o tipo e o tamanho dos tecidos, protegendo-os do envelhecimento e de danos que ameacem a homeostase (HENGARTNER 2000).

Historicamente, a morte celular tem sido dividida em mecanismos regulado e desregulado. A morte celular desregulada, frequentemente chamada de necrose, é causada por estresse celular secundário a uma lesão aguda que leva ao rompimento das células que, por sua vez, liberam o seu conteúdo nas células vizinhas, gerando uma resposta inflamatória potencialmente prejudicial (DEGTEREV e YUAN 2008). A apoptose, ou a forma regulada de morte celular, é o mecanismo de destruição fisiológica da célula que é estimulado por ações intracelulares ou por intermédio de receptores externos, que visa evitar a degeneração de um organismo (ASSUNÇÃO GUIMA-

RÃES e LINDEN 2004).

A apoptose pode ser desencadeada por mecanismos intrínsecos e extrínsecos. A maquinaria intracelular depende de uma família de proteases que apresenta uma cisteína no sítio ativo e cliva suas proteínas-alvo em ácido aspártico específico, denominada caspases, que são sintetizadas na célula através de um precursor inativo (ou pró-caspases) que pode ser ativado por estímulos extracelulares como, por exemplo, os linfócitos T citotóxicos, através da proteína ligante Fas, ou por estímulos intracelulares, através da ativação da via mitocondrial (HERSEY 2006).

A morte celular por apoptose caspase-mediada depende de estímulos que promovam a conversão de seus precursores (pró-caspases) em proteases maduras (caspases). Assim, as caspases iniciadoras (caspases 1, 2, 4, 5, 8, 9, 10 e 14) são ativadas por oligomerização induzida e autoprocessada, enquanto as caspases efetoras (caspases 3, 6 e 7) são ativadas por outras proteases, incluindo as caspases iniciadoras. A clivagem proteolítica de substratos celulares por caspases efetoras determina, em grande parte, as características de morte celular por apoptose. Três vias principais foram identificadas de acordo com a caspase iniciadora: a via caspase-receptora, que envolve a caspase 8 (ativada pela família Fas); a via do retículo endoplasmático, atribuída à ativação de caspase 12; e a via mitocondrial, na qual vários fatores podem desencadear a liberação de proteínas pela mitocôndria, como o citocromo C, o Smac/Diablo, a protease apoptótica ativadora do fator 1 (Apaf-1) e a endonuclease G, que levam à ativação da caspase 9 e à clivagem das caspases 3, 7 ou 6. Embora a caspase 3 esteja amplamente

envolvida na apoptose, as suas funções efetoras podem ser dispensáveis para morte celular por apoptose (ASSUNÇÃO GUIMARÃES e LINDEN 2004; HERSEY 2006).

A via intrínseca atua na homeostase intracelular, e algumas das proteínas da apoptose atuam nas membranas interna e externa da mitocôndria, aumentando a permeabilidade da membrana externa e possibilitando a saída de substâncias que atuam na morte celular. A esse processo dá-se o nome de Permeabilização da Membrana Mitocondrial Externa ou MOMP (LIU et al. 2004).

Para esse processo, há três mecanismos principais que, inclusive, podem se relacionar (GREEN e REED 1998; HENGARTNER 2000; GREEN e KROEMER 2004; ASSUNÇÃO GUIMARÃES e LINDEN 2004), a saber:

1. Interrupção do transporte de elétrons e metabolismo de energia (citocromo C e ATP, respectivamente);

2. Liberação de proteínas ativadoras da família caspases, que ocorre através das proteínas da família Bcl, que consiste em um grupo grande de proteínas que atuam na mitocôndria, algumas com função pró-apoptótica e outras com ação antiapoptótica. 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. A proteína Bcl-2 e outras, como a Bcl-xL, têm função antiapoptótica, bloqueando a liberação do citocromo C da mitocôndria.

3. Alteração do potencial de oxi-redução celular. Quando todas as mitocôndrias da célula são afetadas, ocorre fosforilação oxidativa incompleta e

hidrólise acelerada de ATP, e esse evento é considerado como hipótese de autofagia, apoptose e necrose.

Já está bem estabelecido que falhas no processo de apoptose podem ter grande impacto no desenvolvimento de tumores malignos, que resultam do desequilíbrio entre proliferação e morte celular (NAKAGAWA et al. 1995). No caso do melanoma, a apoptose é um processo central na biologia tumoral, e as interações de suas vias de ativação e inibição, ainda pouco entendidas, contribuem para a resistência aos quimioterápicos, que é uma das principais características desse tumor (HUSSEIN et al. 2003).

2.3 PROTEÍNAS INIBIDORAS DE APOPTOSE (IAPS)

As proteínas inibidoras de apoptose (IAPs) são proteínas intracelulares, reguladores antiapoptóticos, caracterizadas pela capacidade de inibir diretamente as caspases pela presença de um ou mais domínios de repetição, isolados primeiramente em baculovírus, um grupo de vírus específicos de insetos, que se ligam diretamente às caspases (SILKE et al. 2005). Todas as IAPs são caracterizadas pela presença da última banda baculovírus IAP repetida (BIR). Os seus homólogos humanos incluem proteínas inibidoras da apoptose neuronal (NAIP), c-IAP1, c-IAP2, XIAP e Survivina (HUSSEIN et al. 2003). Muitas proteínas IAP, incluindo a c-IAP1 e a c-IAP2, contêm um terminal carboxila no anel de domínio que pode funcionar como uma ubiquitina ligase E3. A atividade de E3 no anel de domínio em c-IAP1 e c-IAP2 foi previamente mostrada como reguladora negativa das propriedades inibidoras

da apoptose das proteínas c-IAP e como promotora de autoubiquitinação e degradação de c-IAP1, dificultando as tentativas de definir as propriedades celulares dessa proteína. A propriedade especializada das proteínas c-IAP está na sinalização da família do fator de necrose tumoral (TNF), através da ligação com os Fatores Associados ao Receptor-TNF (TRAFs), mais notadamente TRAF1 e TRAF2. Sabe-se que as c-IAPs 1 e 2 participam ativamente na via de sinalização adicional da apoptose, e que a c-IAP-1, quando estabilizada, pode proteger a célula de morte por apoptose, mas ainda não se conhece mecanismo utilizado para isso (CSOMOS et al. 2009).

Dentre as proteínas IAPs, a mais intensamente estudada é a IAP ligada ao X (XIAP), que contém três BIRs. BIR3 é necessário e suficiente para a ligação e inibição da caspase 9 pela XIAP, enquanto BIR2, juntamente com um pequeno amino proximal no domínio terminal, está envolvido na ligação e na inibição das caspases 3 e 7. Curiosamente, as XIAPs se mostraram elevadas em neoplasias e, assim, tornaram-se um alvo promissor em terapias antineoplásicas. A propriedade inibidora da caspase pela XIAP pode ser neutralizada pela proteína Smac/Diablo, que é uma proteína mitocondrial liberada no citosol devido à permeabilização das membranas mitocondriais. A ligação com Smac pode deslocar a XIAP através da interação, liberação da caspase e diminuição do limiar celular para apoptose. Muitos estudos têm revelado a natureza da interação entre Smac e XIAP, através do desenvolvimento de compostos de fibra sintética que se assemelham a essa interação. Curiosamente, também tem se observado que alguns desses interagem com pelo menos duas outras IAPs (a c-IAP2 e a c-IAP1). Sugere-se que as

interações de IAP1 e IAP2 com Smac mimetizam resultados indiretos de redução de apoptose, afetando a ativação da rede de transcrição NF- κ B, em vez de aliviarem diretamente as pressões sobre as caspases. Ainda menos claro é o entendimento da contribuição da XIAP para os efeitos pró-apoptóticos desses compostos e da forma como a XIAP pode ser um alvo molecular para o projeto de novas drogas (DUCKETT 2005; GALBÁN et al. 2009).

2.3.1 XIAP

A proteína inibidora de apoptose ligada ao X (XIAP) parece ser a mais potente das IAPs na inibição das caspases (EMANUEL et al. 2008). É o único membro da família IAP capaz de promover a inibição direta das fases tanto de iniciação quanto de execução da cascata apoptótica. Inibe a iniciação dessa cascata pela inibição da caspase-9, e inibe a fase de execução pela inibição das caspases efetoras 3 e 7. As IAP promovem ubiquitinação e degradação proteossomal das caspases às quais se ligam pela via dos anéis de domínio, o que lhes permite servir como ubiquitina-ligase E3 (KLUGER et al. 2007).

A XIAP se expressa em alto nível mediante a inibição dessas proteínas centrais mediadoras de apoptose e, dessa forma, permite que as células malignas escapem da morte celular programada, o que potencializa o crescimento e a sobrevivência do tumor (EMANUEL et al. 2008).

XIAP associada ao fator 1 (Xaf1) foi identificada como proteína nuclear que se liga à XIAP e suprime a sua atividade anticaspase, revertendo,

assim, o efeito protetor da superexpressão de XIAP em linhagens celulares de câncer. A expressão de Xaf1 é significativamente reduzida em linhagens de células tumorais e em vários tumores malignos primários, como resultado da hipermetilação do promotor. Além disso, a reativação de Xaf1 pelos inibidores da metilação do DNA sensibiliza as células cancerosas a agentes indutores de apoptose (ARORA et al. 2007).

ZHANG et al. (2001) demonstraram a regulação de XIAP em um número limitado de linhagens celulares de melanoma, e BOWEN et al. (2003) observaram maior expressão de XIAP em quatro linhas de células de melanoma em melanócitos normais, e encontraram associação entre a expressão de XIAP e resistência à quimioterapia e à radioterapia. No entanto, não existem grandes estudos de coorte que avaliem cuidadosamente os níveis de expressão de XIAP em amostras de pacientes com melanoma (KLUGER et al. 2007).

2.3.2 Survivina

A Survivina é a única IAP que contém um único IAP baculovírus repetido e não tem anel de domínio, e já foi encontrada ampla expressão dessa proteína em diferentes tipos de câncer, o que a elege a alvo promissor no tratamento dessa doença (ARORA et al. 2007). Ela tem sido implicada no controle de mitose e citocinese e, mais recentemente, demonstrou ser importante componente de um complexo regular de alinhamento cromossômico durante a mitose (PIRAS et al. 2007; THOMAS et al. 2007).

Duas vias de atuação da Survivina, distintas do ponto de vista imunohistoquímico, têm sido envolvidas nesse processo: a via nuclear, que tem

sido sugerida como promotora de proliferação celular, e a via citoplasmática, relacionada com o controle da sobrevivência celular. Imunorreatividade para Survivina citoplasmática tem sido observada em grande quantidade de tumores humanos e relacionada com pior prognóstico (PIRAS et al. 2007).

A expressão transgênica de Survivina nos queratinócitos da pele não se mostrou associada com aumento da proliferação dessas células nem com hiperplasia epidérmica, assim como não foi observada superexpressão de Survivina em células HeLa; portanto, parece não afetar a progressão do ciclo celular (LIU et al. 2006). Estudo mais recente sugere que a expressão de Survivina em tumores pode ser mais importante na inibição da apoptose do que na ativação de proliferação celular. Assim como as outras IAPs, que funcionam como inibidoras de caspase, a Survivina parece proteger as células contra a apoptose induzida por estímulos diversos, cujos mecanismos de proteção apoptótica podem variar de acordo com o tipo de célula e com o estímulo apoptótico (THOMAS et al. 2007). A ação citoprotetora pode estar, ainda, na capacidade de a Survivina associar-se à XIAP e de melhorar a sua estabilidade, antagonizando a função da ligase E3 no anel de domínio (ARORA et al. 2007).

Outros estudos apontam que a superexpressão de Survivina parece inibir a apoptose iniciada pelas vias intrínseca ou extrínseca, através da inibição da caspase 2, e que também parece estar associada com resistência a terapias (PIRAS et al. 2007).

A Survivina é particularmente importante em melanomas, pois, ao contrário de outros inibidores da apoptose, não se expressa em melanócitos.

Em contrapartida, THOMAS et al. (2007) detectaram expressão de Survivina cerca de 85% dos melanomas localizados e em todos os melanomas metastáticos examinados. Sua expressão em nevos sugeriu, também, que se trate de um marcador de melanócitos neoplásicos, o que lhe atribuiria papel importante na detecção precoce de melanoma. Esses mesmos pesquisadores demonstraram, ainda, que o bloqueio de Survivina em células de melanoma é suficiente para a indução de apoptose, para sensibilização à quimioterapia e para inibição do crescimento tumoral de melanoma *in vivo*.

Finalmente, a expressão de Survivina em células tumorais tem sido observada em pacientes com melanoma tanto primário quanto metastático, e já estão sob investigação valores dessa expressão que possam vir a ser usados como marcadores prognósticos em linfonodos-sentinela (PIRAS et al. 2007).

2.3.3 Smac/Diablo

Smac/Diablo é uma proteína de baixo peso molecular, identificada como uma proteína competidora das IAPs na vias das caspases. A Smac/Diablo se encontra armazenada dentro das mitocôndrias, e é liberada no citoplasma em resposta a estímulos apoptóticos que perturbem a integridade dessa organela (HUSSEIN et al. 2003; LIU et al. 2004). Regula principalmente a XIAP, ligando-se aos domínios BIR2 e BIR3 e promovendo a atividade iniciadora da caspase 9 e atividade efetora das caspases 3 e 7 pela neutralização do efeito inibitório das IAPs (SRINIVASULA et al. 2000; WU et al. 2000; DUCKETT 2005). Quando a XIAP se liga à Smac/Diablo, as cas-

pases são deslocadas para a atividade de execução da apoptose (DUCKETT 2005).

SILKE et al. (2005) identificaram que mesmo XIAPs mutantes com defeito na inibição da caspase, mas que mantinham as propriedades de ligação com a Smac, mostraram ação citoprotetora. Segundo os autores, as implicações dos resultados observados foram intrigantes, pois, se a ligação da Smac/Diablo com XIAP neutraliza os efeitos citoprotetores de XIAP, como a ligação XIAP-Smac/Diablo poderia bloquear a ação promotora de morte celular da Smac/Diablo? Qual dessas direções seria a mais importante? Uma forma de tentar encontrar uma resposta para essas questões seria examinar as células com XIAP ou Smac/Diablo deficientes para, assim, determinar qual XIAP seria ainda citoprotetora em uma célula com Smac/Diablo inativa, ou se a Smac/Diablo poderia potencializar a morte de uma célula com XIAP deficiente. No entanto, a Smac/Diablo não se liga apenas à XIAP, mas também a outras IAPs; além disso, outras proteínas adicionais que têm sido identificadas podem funcionar de forma análoga à Smac/Diablo, como a MIAP e a ILP2 (DUCKETT 2005).

CREAGH et al. (2004) propuseram que a associação de Smac-Diablo com as IAPs ocorreria por meio da repressão da atividade ubiquitina ligase de XIAP, c-IAP1 e c-IAP2, uma vez que observaram que a Smac/Diablo antagonizou tanto a auto ubiquitinação da XIAP quanto a ubiquitinação de XIAP dependente da caspase 7. Os mesmos autores também observaram que XIAP mutantes sem função no anel de domínio, em especial a XIAP do tipo selvagem, foram significativamente menos eficazes na inibição de apoptose,

o que parece sugerir que a atividade de ubiquitina-ligase das IAP contribui para a sua função antiapoptótica. Assim como CREAGH et al. (2004), também WILKINSON et al. (2004) observaram que as IAPs neutralizam a Smac/Diablo, o que, por sua vez, reprime as atividades intrínsecas da ubiquitina ligase dessas proteínas.

A relação entre Smac/Diablo e melanoma é controversa, uma vez que nas células com melanoma são encontrados altos níveis de caspase 3 e de Smac/Diablo e baixos níveis de XIAP. Entretanto, ainda não se sabe se essas observações se devem ao bloqueio da XIAP e de outras IAPs pelo Smac ou mesmo por outras proteínas liberadas pelas mitocôndrias, como o citocromo-C, levando à liberação das caspases. Também ainda é controversa a sua relação com outras famílias de proteínas, como a Bcl2, também envolvidas na via mitocondrial da apoptose (ZHANG et al. 2001).

De uma maneira geral, a relação entre os inibidores da apoptose e melanoma é pouco entendida, e controversa. Sabe-se apenas que contribui para a resistência aos quimioterápicos, bem como a relação de XIAP com este processo, sua interação com Smac-Diablo, a via da apoptose e desenvolvimento do melanoma. Survivina, por outro lado, com ampla expressão em melanócitos neoplásicos, vem sendo investigada como alvo promissor como marcador prognóstico, justificando-se o estudo dessas proteínas como forma de tentar entender o mecanismo de atuação e expressão em melanoma e a possível relação com o prognóstico dos pacientes da amostra estudada.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a associação entre a expressão das proteínas c-IAP2, XIAP, Survivina e Smac/Diablo e a sobrevida câncer-específica e livre da doença dos pacientes em cinco anos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Estudar a expressão imuno-histoquímica das proteínas inibidoras de apoptose c-IAP2, XIAP, Survivina e Smac/Diablo em microarranjos de tecido (TMA) de melanomas primários com espessura igual ou maior que 1 mm de pacientes com ou sem micrometastases em linfonodo sentinela.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 CASUÍSTICA

Em consulta ao Arquivo do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital AC Camargo, foram consultados os prontuários de pacientes que, conforme os critérios de inclusão para este estudo, apresentavam melanoma primário com espessura igual ou maior que 1,0 mm e que haviam necessariamente sido submetidos ao estudo do linfonodo sentinela no período de 1997 a 2007. Para a composição desta amostra, também foi condição fundamental que lâminas e blocos de tecido tumoral desses pacientes estivessem disponíveis em quantidade suficiente para confecção do TMA.

Foram excluídos da seleção pacientes com mais de um melanoma primário, com outros tipos de câncer, ou com melanomas originados de nevo congênito gigante, melanomas *in situ* ou melanomas desmoplásicos.

Em atendimento aos critérios de inclusão e exclusão adotados para esta investigação, de um universo de 250 pacientes com melanoma primário submetidos ao estudo de linfonodo sentinela no período estipulado, restaram 63 pacientes que compuseram a amostra deste estudo.

4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1 Protocolo de estudo

Para este estudo analítico observacional, de coorte retrospectivo, devidamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Antônio Prudente (Anexo 1), foi elaborado protocolo para coleta de dados que incluíram informações demográficas, clínicas, histológicas e relativas à evolução da doença e do paciente (Quadro 1). Esses dados foram coletados dos prontuários médicos arquivados no Serviço de Arquivo Médico e Estatística (SAME) do Centro de Tratamento e Pesquisa do Hospital do Câncer A.C. Camargo da Fundação Antonio Prudente de São Paulo.

Embora constem do protocolo, os dados de tratamento não foram analisados, tendo em vista os objetivos deste estudo.

Quadro 1 - Tipo de informações coletadas de prontuários médicos de 63 pacientes com melanoma primário com espessura ≥ 1 mm para preenchimento de protocolo de estudo.

1. Dados demográficos dos pacientes	1.1 Gênero 1.2 Idade 1.3 Raça 1.4 Antecedentes pessoais de melanoma 1.5 Antecedentes familiares de melanoma
2. Dados do tumor primário	2.1 Localização do tumor primário 2.1.1 cabeça 2.1.2 pescoço 2.1.3 membros superiores 2.1.4 palmas 2.1.5 tronco 2.1.6 membros inferiores 2.1.7 plantas do pé 2.1.8 outras 2.2 Tipo de biópsia 2.3 Informações anátomo-patológicas 2.3.1 tipo histológico 2.3.2 espessura do tumor (índice de Breslow) 2.3.3 tipo de crescimento tumoral (radial ou vertical) 2.3.4 nível de invasão do tumor (classificação de Clark) 2.3.5 taxa de mitoses 2.3.6 presença de ulceração 2.3.7 presença de satelitoses 2.3.8 presença de regressão 2.3.9 presença de invasão sanguínea 2.3.10 presença de invasão linfática 2.3.11 presença de invasão neural
3. Dados de disseminação tumoral	3.1 Pesquisa de linfonodo sentinela (positiva ou negativa) 3.1.1 número de linfonodos acometidos 3.1.2 localização dos linfonodos acometidos 3.1.2.1 cervical à direita ou à esquerda 3.1.2.2 axilar à direita ou à esquerda 3.1.2.3 inguinal à direita ou à esquerda 3.1.2.4 outras localizações 3.1.3 informações da linfadenectomia 3.1.3.1 data da cirurgia 3.1.3.2 número total de linfonodos retirados 3.1.3.3 número total de linfonodos positivos
4. Dados do tratamento	4.1 Tipos de tratamento (radioterapia, quimioterapia adjuvante ou neoadjuvante, imunoterapia, perfusão)
5. Dados da evolução dos pacientes	5.1 Recidivas 5.1.1 data da primeira recidiva 5.1.2 locais de recidiva (pele e tecido subcutâneo, sistema nervoso central, fígado, ossos, outros) 5.2 Situação do paciente na última informação registrada 5.2.1 data da última informação registrada em prontuário 5.2.2 vivo sem evidência da doença 5.2.3 vivo com câncer 5.2.4 morte decorrente do câncer 5.2.5 morte por outras causas não relacionadas ao câncer

4.2.2 Coleta de lâminas e blocos

Os preparados histológicos de melanomas das lâminas e blocos disponíveis em quantidade suficiente nos prontuários dos pacientes foram revistos para confirmação diagnóstica e para estabelecimento dos parâmetros prognósticos, conforme estabelecidos pelo Grupo Brasileiro de Melanoma e pela Sociedade Brasileira de Patologia.

4.2.3 Confeção do TMA

O microarranjo em matriz de amostras teciduais, ou *tissue microarray* (TMA), é uma técnica baseada na construção de um bloco de parafina contendo fragmentos cilíndricos de amostras teciduais ou tumorais obtidos de dezenas ou centenas de blocos de parafina originais (ANDRADE et al. 2007).

Dentre as diversas vantagens do bloco de TMA em relação ao corte tradicional, destacam-se a grande economia de reagentes e de tempo para a realização das reações, a uniformização das reações e a facilidade na análise comparativa dos casos. Possibilita, ainda, a repetição das reações em diversos níveis do bloco, o que permite o uso de um mesmo bloco para diferentes estudos que componham linhas de pesquisa específicas (ANDRADE et al. 2007).

Os blocos com tecido tumoral dos pacientes incluídos neste estudo foram utilizados para a construção de TMAs, e as áreas representativas dos tumores foram cuidadosamente selecionadas em lâminas coradas por HE. As áreas tumorais selecionadas foram retiradas do bloco doador e adiciona-

das ao bloco receptor com auxílio do Manual *Tissue Arrayer 1* (*Beecher Instruments Microarray Technology*, Silver Spring, EUA). Foram utilizados dois fragmentos de cada amostra, compreendendo regiões diferentes do tumor, que foram depositados de forma coordenada no bloco receptor. Os fragmentos tumorais de 1,0 mm foram arranjados em duplicata, com intervalos de 0,2 mm entre as amostras. Os cortes seriados do bloco de TMA foram depositados em lâminas silanizadas (*Starfrost*[®]) recobertas com adesivo e submetidas à fixação por UV (*Instrumedics Inc*[®], Hackensack, NJ, EUA). Posteriormente, as lâminas passaram por um banho de parafina e foram armazenadas em temperatura de -20°C no freezer antes de serem analisadas por técnicas histoquímicas.

A leitura das lâminas foi realizada por um mesmo patologista em microscópio óptico comum, e os resultados foram classificados de acordo com a intensidade da reação positiva.

4.2.4 Imuno-histoquímica (IHQ)

As reações imuno-histoquímicas foram realizadas de modo automatizado na plataforma *Benchmark*[®], *Ventana Medical Systems* (Illkirch, Cedex, França). Esse aparelho é utilizado para melhor diluição, recuperação antigênica, revelação e cromógeno do anticorpo. Todas as etapas foram executadas pela máquina, a saber: desparafinização, re-hidratação, recuperação antigênica, bloqueio da peroxidase endógena, reação com anticorpo primário e secundário e revelação.

Essa plataforma utiliza os seguintes reagentes:

1. Fluidos volumosos

- EZ PREP: solução de desparafinização patenteada pela *Ventana Medical Systems*, livre de álcool e xilol, cuja formulação dos reagentes não está disponível. É adicionada às placas aquecidas em que são depositadas as lâminas para o processo de desparafinização.

- LCS (*Liquid Coversli*): solução oleosa de baixa densidade responsável por formar uma câmara de reação sobre a lâmina, de modo a permitir a homogeneização dos reagentes e não deixar que eles evaporem e ressequem durante o processo.

- CC1 (*Cell Conditioning One*): solução tampão de pH levemente alcalino à base de TRIS usada como pré-tratamento no processamento de tecidos. Quando em alta temperatura, é capaz de romper as ligações covalentes formadas pela formalina no tecido, permitindo a reativação antigênica e aumentando a acessibilidade ao anticorpo.

- *Reaction Buffer*: solução de tampão pH 7,4 responsável por promover ambiente aquoso para a reação imuno-histoquímica e pela lavagem das lâminas entre os vários passos da reação.

2. Kit de Detecção: *UltraView Universal DAB Detection Kit*

Trata-se de um kit contendo cinco dispensadores com tecnologia baseada em um sistema de detecção por multímeros para detecção sensível e específica de anticorpos primários de coelho e camundongo. O kit é livre de biotina, eliminando a marcação inespecífica proveniente da biotina endógena. Além dos componentes do kit de detecção, no momento da realização da técnica são acoplados ao *rack* dois outros dispensadores:

- Hematoxilina de Mayer's modificada;

- *Bluing Reagent*: solução aplicada após a hematoxilina para a sua contracoloração.

Como anticorpos primários, foram usados anticorpos do ciclo da apoptose celular previamente padronizados e diluídos em 1:100, a saber:

- Para o estudo da c-IAP2, foi utilizado o anticorpo policlonal de rato liberado contra os aminoácidos de c-IAP2 de origem humana (*Santa Cruz Biotechnology*, Referência SC-7944). Embora esse anticorpo core citoplasma e núcleo, apenas o citoplasma foi corado em nossas amostras (Figuras 1 e 2 resultados).

- Para o estudo da XIAP, foi utilizado anticorpo policlonal de coelho liberado contra XIAP humana (*Santa Cruz Biotechnology*, Referência SC-11426). Esse anticorpo cora o citoplasma (Figuras 3 e 4 resultados).

- Para o estudo da Survivina, foi utilizado o anticorpo policlonal de rato liberado contra Survivina de humanos (*Thermo Scientific*). Embora esse anticorpo core citoplasma e núcleo, apenas o citoplasma foi corado em nossas amostras (Figuras 5 e 6 resultados).

- Para o estudo da Smac/Diablo, foi utilizado o anticorpo monoclonal de coelho liberado contra Smac/Diablo de humanos (*Epitomics*, Catálogo 1012-1). Esse anticorpo cora o citoplasma (Figuras 7 e 8 resultados).

A) Avaliação das reações de IHQ

As 63 amostras submetidas às reações imuno-histoquímicas foram interpretadas a partir de padronização semiquantitativa, de acordo com a intensidade da reação e com a porcentagem de tecido tumoral com coloração positiva para a presença do anticorpo. Desse modo, estabeleceram-se as seguintes graduações de intensidade:

- 0 : quando não há reação imuno-histoquímica nas células neoplásicas.
- +1: quando a reação imuno-histoquímica se apresentou com leve intensidade nas células neoplásicas;
- +2: quando a reação imuno-histoquímica se apresentou com intensidade moderada nas células neoplásicas;
- +3: quando a reação imuno-histoquímica se apresentou com forte intensidade nas células neoplásicas.

Com relação à porcentagem de tecido tumoral com coloração positiva para a presença do anticorpo, foram estabelecidas as seguintes graduações:

- +1: reação observada em menos de 10% do tecido tumoral;
- +2: reação observada em 10% a <40% do tecido tumoral;
- +3: reação observada em 40% a <60% do tecido tumoral;
- +4: reação observada em 60% a 100% do tecido tumoral.

Os escores de intensidade de coloração e de porcentagem tumoral com coloração positiva em cada uma das amostras do TMA foram somados, e o resultado dessas somas determinou negatividade (escores 0 a <2) ou positividade (escores 2 a 7) para o anticorpo analisado.

4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados coletados foram tabulados em planilha do programa *Excel 9.0 for Windows*, e depois transformados em valores descritivos, tanto como frequências (variáveis qualitativas) quanto como medidas-resumo, ou seja, média, desvio-padrão e valores mínimo e máximo (variáveis quantitativas). Valores expressos em médias e desvios-padrão foram comparados com o emprego do Teste *t* de Student.

Foram construídas curvas de Kaplan-Meier para análise univariada da sobrevida, e a comparação dessas curvas foi analisada com a aplicação do teste de *log-rank*.

Para os cálculos estatísticos, foi utilizado o programa livre R, disponível em www.r-project.org). Adotou-se probabilidade de rejeição da hipótese de 5% para determinação da significância dos achados ($p \leq 0,05$).

5 RESULTADOS

5.2 ACHADOS CLÍNICO-DEMOGRÁFICOS

A distribuição das frequências dos achados clínico-demográficos dos 63 pacientes se encontram na Tabela 1.

A idade desses pacientes ao diagnóstico da doença variou entre 21 e 85 anos, com média de $55,3 \pm 15,7$ anos e mediana de 56 anos. Essas médias foram similares ($p = 0,574$) quando comparados pacientes do gênero masculino ($57,8 \pm 16,0$ anos) e feminino ($55,3 \pm 18,8$ anos).

Ressalte-se que dados sobre antecedentes pessoais e familiares de melanoma não estavam registrados em quantidade importante de prontuários (respectivamente, 32 e 35 prontuários).

Tabela 1 - Distribuição das frequências relativas aos achados clínico-demográficos em amostra de 63 pacientes com melanoma de espessura igual ou maior que 1,0 mm.

Dados clínico-demográficos	n	%
Gênero		
Feminino	29	46,0%
Masculino	34	54,0%
Antecedentes pessoais de melanoma		
Não	30	97,0%
Sim	1	3,0%
Antecedentes familiares de melanoma		
Não	28	93,3%
Sim	2	6,7%

5.2 LOCALIZAÇÃO DOS TUMORES

Na Tabela 2 se encontram as frequências relativas à localização dos tumores primários. O tronco e os membros inferiores foram as localizações acometidas com maior frequência. Em cinco prontuários não havia registro da localização do tumor primário.

Tabela 2 - Distribuição das frequências relativas à localização dos tumores primários em amostra de 63 pacientes com melanoma de espessura igual ou maior que 1,0 mm.

Localização do tumor primário	n	%
Cabeça	5	8,6%
Pescoço	1	1,7%
Membros superiores	10	17,2%
Tronco	17	29,3%
Membros inferiores	17	29,3%
Planta do pé	7	12,1%
Outra	1	1,7%

5.3 ACHADOS HISTOPATOLÓGICOS

Na Tabela 3 está a distribuição das frequências relativas aos achados histopatológicos neste grupo de pacientes.

Ressalte-se que não havia registro sobre o tipo histológico em três prontuários; sobre o crescimento tumoral, em quatro; sobre o Índice de Clark, em seis; e sobre o índice mitótico, em cinco. Também houve prontuários sem registro de dados sobre presença de ulceração (oito); regressão (dois); invasão sanguínea (dois), invasão linfática (dois); satelitoses (dois).

A espessura dos tumores primários variou de 1 mm a 14 mm, com média de $3,00 \pm 2,50$ mm. Embora a variância desses valores tenha sido significativamente maior no grupo feminino ($F = 5,60$; $p = 0,030$), não houve diferença ($p = 0,856$) entre as médias da espessura do tumor para homens ($3,00 \pm 2,00$ mm) e mulheres ($2,90 \pm 3,00$ mm).

A maior média relativa à espessura dos tumores foi observada naqueles localizados em cabeça ($4,16 \pm 3,40$ mm), seguidos dos tumores primários em planta do pé ($3,89 \pm 4,53$ mm), tronco ($3,00 \pm 2,00$ mm), membros inferiores ($2,99 \pm 2,17$ mm) e membros superiores ($2,76 \pm 1,80$ mm).

Com relação ao tipo histológico, nos tumores do tipo superficial a média de espessura foi de $2,18 \pm 1,90$ mm; nos do tipo acral, foi de $4,59 \pm 4,37$ mm; e no do tipo nodular, foi de $4,72 \pm 1,70$ mm. Os tumores classificados em outros tipos histológicos foram os mais espessos (média de $6,35 \pm 0,21$).

Foram observadas correlações positivas fracas entre a espessura dos tumores e respectivos índices mitóticos ($r = 0,30$) e a idade dos pacientes ($r = 0,24$).

Tabela 3 - Distribuição das frequências relativas aos achados histopatológicos em amostra de 63 pacientes com melanoma de espessura igual ou maior que 1,0 mm.

Dados histopatológicos		n	%
Tipo histológico			
	Superficial	39	65,0%
	Nodular	11	18,3%
	Acral	8	13,3%
	Outros	2	3,4%
Crescimento tumoral			
	Vertical	56	94,9%
	Radial	2	3,4%
	Sem crescimento	1	1,7%
Índice de Clark			
	II	2	3,5%
	III	30	52,7%
	IV	20	35,1%
	V	5	8,7%
Índice mitótico			
	0 a 5 / 10 CGA	38	65,5%
	6 a 10 / 10 CGA	13	22,4%
	11 a 21 / 10 CGA	7	12,1%
Ulceração			
	Presente	17	30,9%
	Ausente	38	69,1%
Regressão			
	Presente	0	-
	Ausente	61	100,0%
Invasão sanguínea			
	Presente	0	-
	Ausente	61	100,0%
Invasão linfática			
	Presente	5	8,2%
	Ausente	56	1,8%
Satelitoses			
	Presentes	2	3,3%
	Ausentes	59	96,7%

5.4 ACHADOS DE DISSEMINAÇÃO TUMORAL

Segundo os dados coletados de 58 prontuários médicos em que constava a informação, todos os pacientes foram submetidos à biópsia do linfonodo sentinela que se mostrou positiva para 18 pacientes (31,0%). Em

apenas sete desses casos havia registro da localização do linfonodo sentinela, ou seja, em três pacientes, o linfonodo sentinela se localizava na região inguinal esquerda; nos demais quatro pacientes, localizava-se, cada um, na região inguinal direita, cervical direita, axilar direita ou axilar esquerda.

No total, 33 pacientes foram submetidos à linfadenectomia, e em quatro prontuários não havia essa informação.

5.5 ACHADOS RELATIVOS À EVOLUÇÃO DOS PACIENTES

O tempo médio de seguimento desta amostra foi de $47,98 \pm 26,82$ meses (variação de um a 110 meses).

Em 23 casos (37,7%) dentre os 61 em cujos prontuários havia registro da informação, houve recidiva do tumor primário após tempo médio de $19,93 \pm 12,46$ meses (variação de um a 43 meses). A distribuição das frequências relativas à localização dessas recidivas está apresentada na Tabela 4. Ressalte-se que em dois casos não havia o registro da localização da recidiva.

Tabela 4 - Distribuição das frequências relativas à localização de recidivas em 21 dentre 63 pacientes com melanoma de espessura igual ou maior que 1,0 mm.

Localização das recidivas	n	%
Pele	6	28,6%
Pele e fígado	1	4,8%
Pele e ossos	1	4,8%
Pele + SNC + Outras	1	4,8%
Pele + SNC + Fígado + Ossos + Outras	1	4,8%
Pele + Outras	5	23,7%
SNC + Outras	2	9,5%
Outras	4	19,0%

Seis pacientes (10,5%) faleceram em tempo médio de $27,0 \pm 21,0$ meses (variação de dois a 48 meses). Outros 15 pacientes (26,3%) estavam vivo com a doença em seguimento registrado de $34,1 \pm 26,0$ meses (variação de um a 81 meses), e os demais 36 (63,2%) estavam vivos livre da doença em seguimento de $57,7 \pm 24,0$ meses (variação de um a 110 meses). Informações sobre a evolução do paciente não constavam em seis prontuários.

5.6 COLORAÇÕES IMUNO-HISTOQUÍMICAS

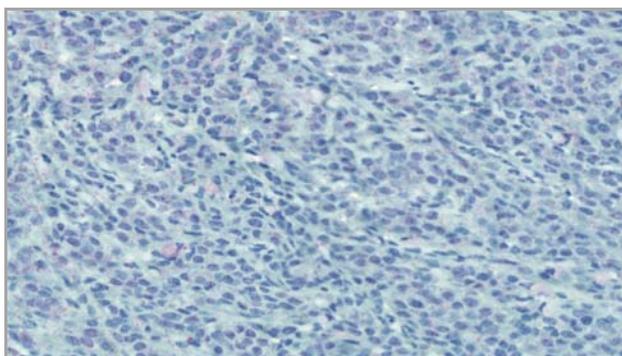


Figura 1 - Amostra negativa para c-IAP2. Aumento 200x.

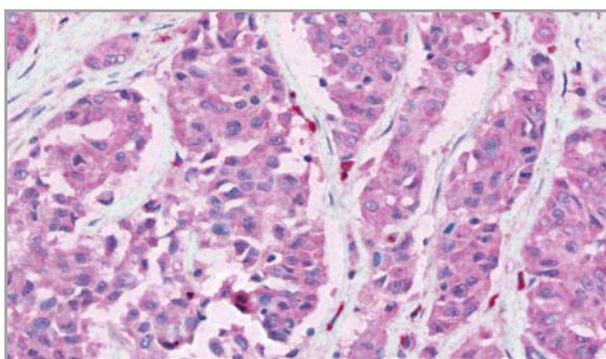


Figura 2 - Amostra positiva para c-IAP2. Aumento 200x. Padrão citoplasmático.

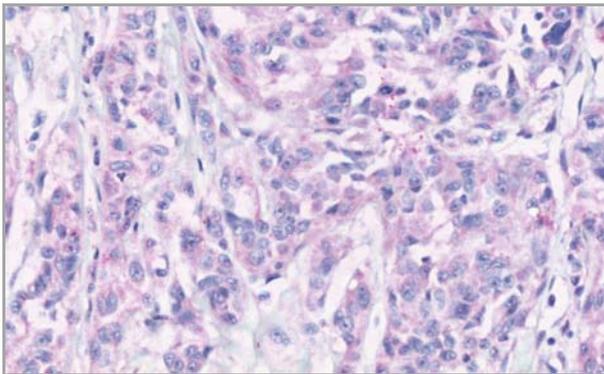


Figura 3 – Amostra fracamente positiva para XIAP. Aumento de 200x. Padrão citoplasmático.

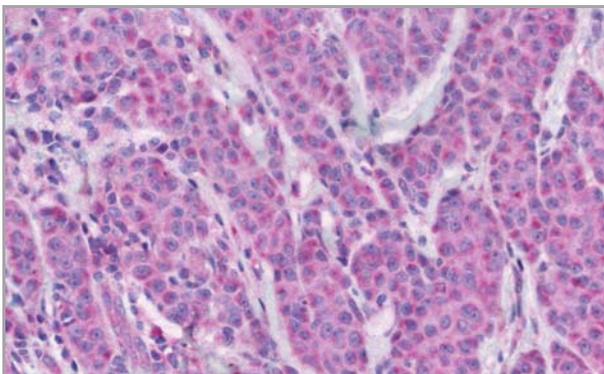


Figura 4 – Amostra positiva para XIAP. Aumento 200x. Padrão citoplasmático.

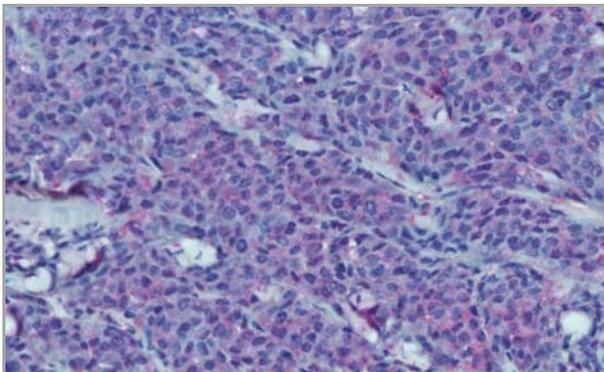


Figura 5 - Amostra negativa para Survivina. Aumento 200x. Padrão citoplasmático.

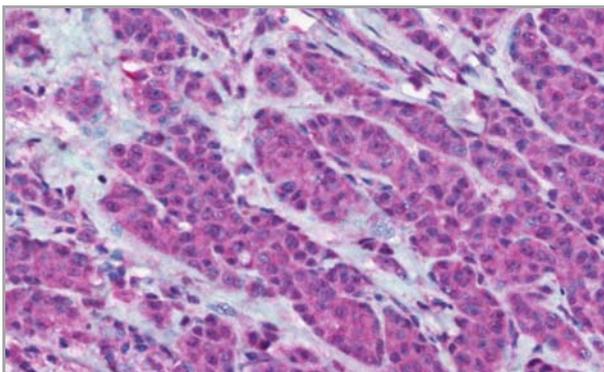


Figura 6 - Amostra positiva para Survivina. Aumento 200x. Padrão citoplasmático.

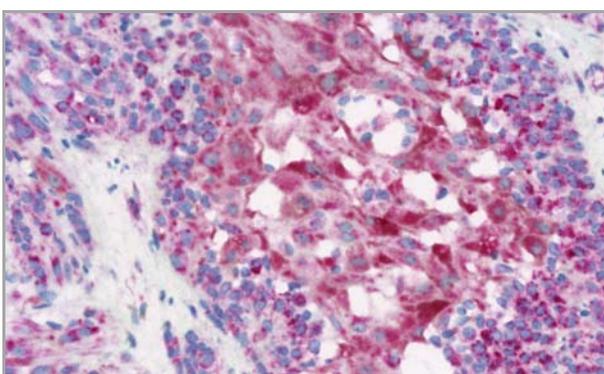


Figura 7 - Amostra fracamente positiva para Smac/Diablo. Aumento 200x. Padrão citoplasmático.

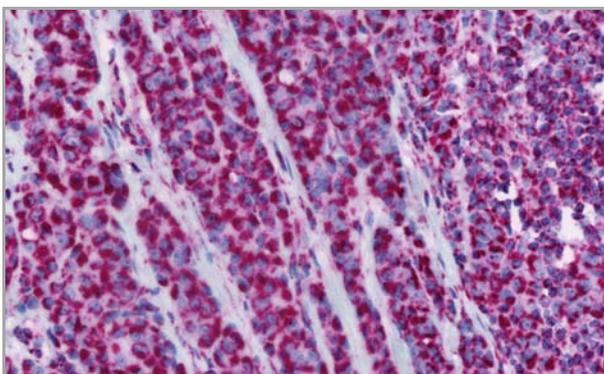


Figura 8 - Amostra positiva para Smac/Diablo. Aumento 200x. Padrão citoplasmático.

5.6.1 ACHADOS IMUNO-HISTOQUÍMICOS

A distribuição das frequências relativas aos escores finais observados no estudo imuno-histoquímico das proteínas inibidoras de apoptose c-IAP-2, XIAP (citoplasmática), Survivina e Smac/Diablo está apresentada na Tabela 5. Escores maiores que 1 indicaram expressão positiva das proteínas avaliadas.

Tabela 5 - Distribuição das frequências relativas aos escores finais observados no estudo imuno-histoquímico das proteínas inibidoras de apoptose c-IAP-2, XIAP (citoplasmática), Survivina e Smac/Diablo.

Escore	Proteínas inibidoras de apoptose							
	c-IAP-2		XIAP (citoplasma)		Survivina		Smac/Diablo	
	n	%	n	%	n	%	n	%
0	13	20,6%	3	4,8%	8	12,69%	8	12,7%
2	1	1,6%	2	3,1%	-	-	-	-
3	1	1,6%	-	-	2	3,17%	-	-
4	5	7,8%	2	3,1%	5	7,93%	1	1,6%
5	12	19,3%	12	19,3%	4	6,34%	3	4,8%
6	9	14,2%	28	44,4%	7	11,11%	5	7,8%
7	3	4,8%	2	3,1%	30	47,61%	35	55,6%
Perda*	19	30,1%	14	22,2%	7	11,11%	11	17,5%

(*) Perda inclui blocos em que não havia tecido tumoral.

Desse modo, excetuando-se os blocos em que não foi possível a análise imuno-histoquímica, a distribuição das reações positivas e negativas à coloração dos antígenos utilizados para as proteínas inibidoras de apoptose avaliadas está representada na Figura 9.

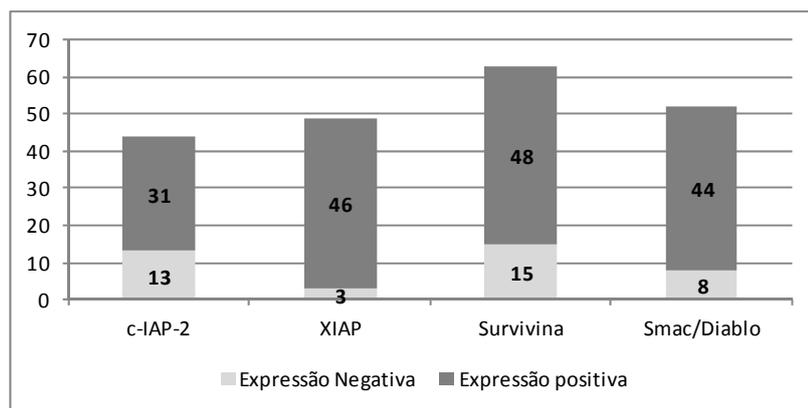


Figura 9 - Distribuição das frequências absolutas relativas às amostras negativas e positivas observadas no estudo imuno-histoquímico das proteínas inibidoras de apoptose c-IAP-2, XIAP (citoplasmática), Survivina e Smac/Diablo.

5.7 INFLUÊNCIA DOS ACHADOS IMUNO-HISTOQUÍMICOS NA SOBREVIDA DOS PACIENTES

Para o cálculo do tempo de sobrevida livre de doença foram consideradas a data da biópsia e a data da recidiva e/ou óbito por melanoma.

Devido à alta frequência de expressão da XIAP citoplasmática, não foi possível incluir essa proteína na análise da evolução dos pacientes.

A análise do risco relativo (RR) para sobrevida câncer-específica em casos de melanoma primário com espessura igual ou maior que 1 mm não evidenciou achados significativos, embora tenha se observado RR de 2,87, 2,53 e 2,91, respectivamente, para casos de positividade para c-IAP-2, Survivina e Smac/Diablo (Tabela 6).

As taxas de sobrevida câncer-específica e livre de doença em cinco

anos foram, no grupo geral, de 83% e 64%, respectivamente. Na Tabela 7, são apresentadas essas taxas calculadas de acordo com a expressão das proteínas inibidoras de apoptose c-IAP-2, Survivina e Smac/Diablo.

Tabela 6 - Risco relativo (RR) de sobrevida câncer-específica em casos de melanoma primário com espessura igual ou maior que 1 mm em relação à expressão das proteínas inibidoras de apoptose c-IAP-2, Survivina e Smac/Diablo.

Variáveis		RR	Intervalo de Confiança (IC = 95%)	Valor de p
c-IAP-2	Negativa	1		
	Positiva	2,87	0,40 – 20,38	0,27
Survivina	Negativa	1		
	Positiva	2,53	0,00 – inf.	0,33
Smac/Diablo	Negativa	1		
	Positiva	2,91	0,30 – 28,35	0,34

Tabela 7 - Taxas de sobrevida câncer-específica e de sobrevida livre da doença em cinco anos, conforme expressão positiva ou negativa das proteínas inibidoras de apoptose c-IAP-2, Survivina e Smac/Diablo, em amostra de pacientes com melanoma primário com espessura igual ou maior que 1 mm.

Proteínas inibidoras de apoptose	Expressão	Taxa de sobrevida câncer-específica	Taxa de sobrevida livre da doença
c-IAP-2	Negativa	72%	50%
	Positiva	90%	76%
Survivina	Negativa	80%	50%
	Positiva	70%	60%
Smac/Diablo	Negativa	75%	40%
	Positiva	89%	73%

Nas Figuras 10 a 12 estão ilustradas as curvas de sobrevida câncer-específica e as de sobrevida livre da doença em cinco anos. Análises *log rank* evidenciaram que a expressão das proteínas inibidoras de apoptose c-

IAP-2, Survivina e Smac/Diablo não influenciou significativamente a evolução dos pacientes com melanoma primário com espessura igual ou maior que 1 mm.

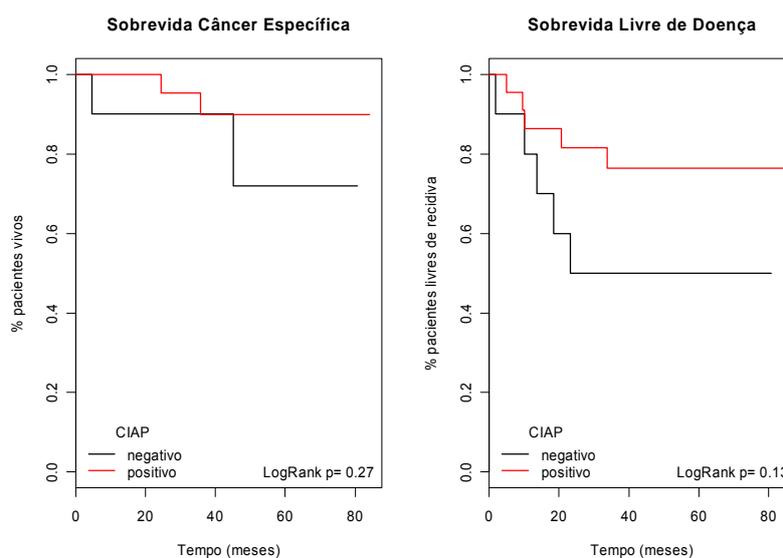


Figura 10 - Curvas de sobrevida câncer-específica e de sobrevida livre da doença em cinco anos, conforme expressão positiva ou negativa de c-IAP-2.

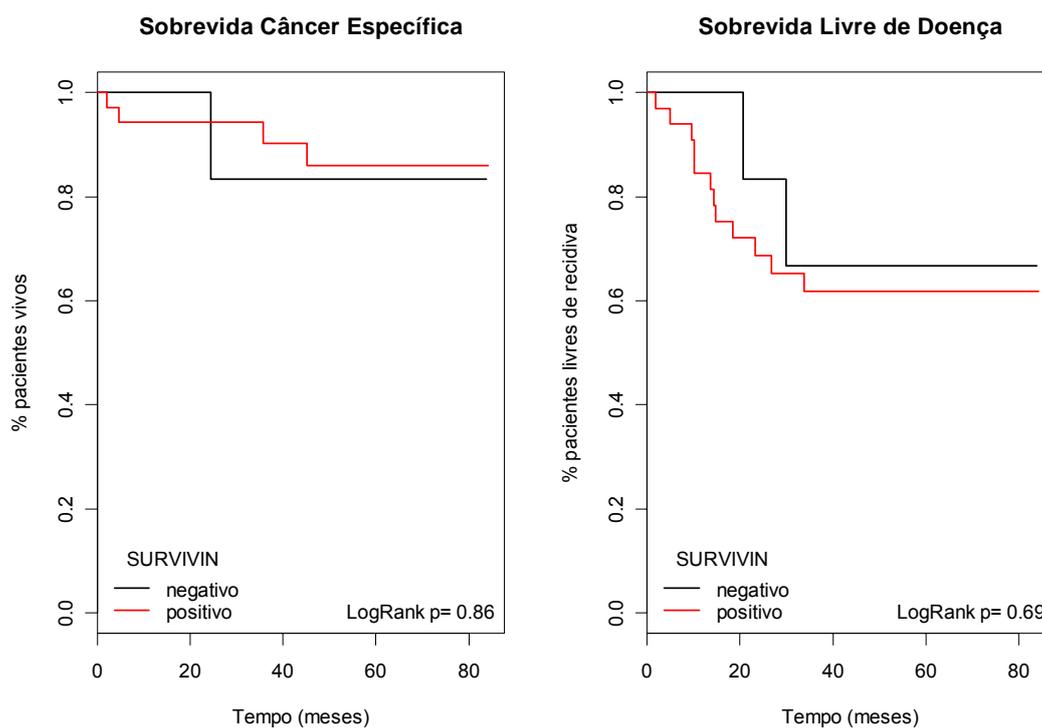


Figura 11 - Curvas de sobrevida câncer-específica e de sobrevida livre da doença em cinco anos, conforme expressão positiva ou negativa de Survivina.

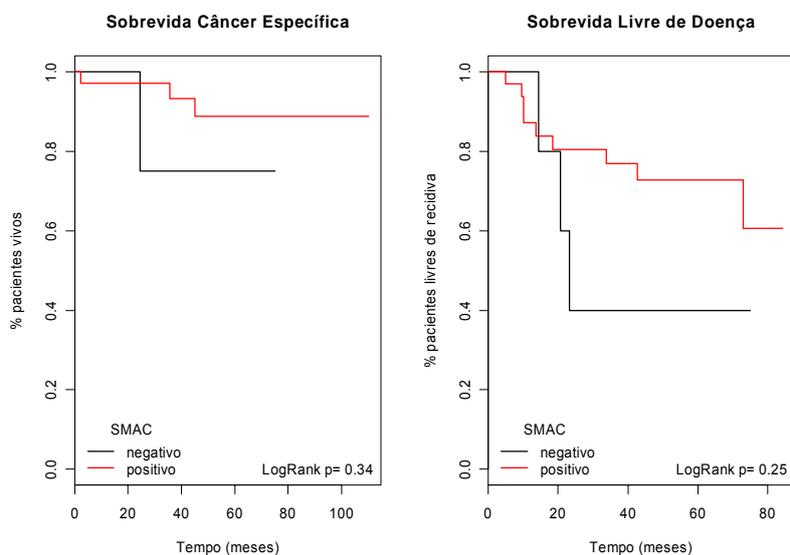


Figura 12 - Curvas de sobrevida câncer-específica e de sobrevida livre da doença em cinco anos, conforme expressão positiva ou negativa de Smac/Diablo.

6 DISCUSSÃO

Neste estudo com 63 pacientes com melanomas primários com espessura igual ou superior a 1 mm, com ou sem micrometástases, foram inicialmente descritos os achados clínicos e histopatológicos dessa amostra. Foram igualmente descritos os achados imuno-histoquímicos resultantes da análise da expressão das proteínas inibidoras de apoptose c-IAP-2, XIAP, Survivina e Smac/Diablo, os quais foram posteriormente correlacionados com a evolução dos pacientes.

Esses pacientes foram selecionados de um universo de 250 casos de melanoma primário tratados entre 1997 e 2007, nos quais vêm sendo investigados diferentes parâmetros que compõem linha de pesquisa voltada ao estudo das vias da apoptose por diferentes pesquisadores. Nessa linha de pesquisa, fomos incumbidos da análise das proteínas inibidoras de apoptose c-IAP-2, XIAP, Survivina e Smac/Diablo em melanomas com espessura igual ou maior a 1 mm.

No que concerne aos achados epidemiológicos em nossa amostra, houve frequência ligeiramente maior de pacientes do gênero masculino (54%). Segundo a literatura, os homens são mais usualmente acometidos pelo melanoma primário do que as mulheres, salvo em regiões onde o hábito de exposição solar mais intensa pelas mulheres pode influenciar esse dado (MACKIE et al. 2009; RIKER et al. 2010). De fato, a pequena diferença nas frequências de homens e mulheres nesta amostra pode ser atribuída ao fato

de o Brasil ser, também, uma região em que a exposição mais intensa ao sol não é infrequente.

A incidência do melanoma aumenta linearmente a partir dos 15 até os 50 anos. Afeta tanto jovens quanto adultos mais velhos, com média de idade de 57 anos para o diagnóstico da doença (MARKOVIC et al. 2007; GODSON e GROSSMAN 2009). Essa assertiva pôde ser ratificada com os achados de nossa amostra, na qual a média de idade ao diagnóstico foi de $55,3 \pm 15,7$ anos, afetando desde jovens de 21 anos até idosos de 85 anos.

Indivíduos com história familiar de melanoma em parentes de primeiro grau têm chance duas vezes maior de desenvolver melanoma do que indivíduos sem história familiar, principalmente se associado a outros fatores de risco como exposição solar. Melanoma familiar corresponde a 10% de todos os casos de melanoma no mundo (MARKOVIC et al. 2007). Infelizmente, informações sobre antecedentes pessoais e familiares de melanoma não foi encontrada em mais da metade dos prontuários examinados, o que nos impede de contribuir com esses dados para a melhor compreensão da doença.

Nossos achados, de certa forma, ratificaram dados da literatura (BANDARCHI et al. 2010) acerca das áreas de aparecimento de melanoma primário, com algumas inversões. Reporta-se que a área mais frequentemente acometida costuma ser o tronco, com incidência de 43,5%, enquanto as extremidades respondem por 33,9%. Em nossa amostra, as extremidades foram as áreas acometidas em 46,5% dos casos, enquanto o tronco foi a área de aparecimento do tumor em 29,3% dos pacientes. Melanomas em cabeça e pescoço são descritos na literatura em 10,9% dos casos, frequên-

cia extremamente próxima da encontrada em nossa amostra (10,3%). A mesma concordância foi observada em relação aos melanomas em região acral, ou seja, observamos 12,1%, frequência muito próxima aos 11,9% relatados na literatura (BANDARCHI et al. 2010).

Com relação ao tipo histológico, conforme classificação de CLARK et al. (1969) complementada por REED (1976), o melanoma extensivo superficial incide em 50% a 75% dos casos; o nodular, em 15% a 35%; o lentigo maligno, em 5% a 15%; e o tipo acral lentiginoso, em 5% a 10% (BANDARCHI et al. 2010; SÁNCHEZ-YUS et al. 2010). Nossos achados corresponderam aos relatos da literatura, porém com frequências ligeiramente superiores no que concerne ao tipo nodular (18,3%) e ao tipo acral (13,3%). Ainda que de incidência mais rara, o melanoma desmoplásico foi critério de exclusão em nosso estudo, uma vez que a sua histologia de células fusiformes está associada a outros tipos de tumor, o que implica, portanto, em pior prognóstico (PAYETTE et al. 2009).

O melanoma se desenvolve em três diferentes estágios que vão do crescimento radial para o crescimento vertical e, daí, para a doença metastática (ALONSO et al. 2004). A fase de crescimento radial é aquela em que o tumor se encontra restrito a epiderme, sem evidência de mitoses, apenas com aumento no diâmetro da lesão; na a fase de crescimento vertical, o tumor já se encontra na derme, com evidência de mitoses e presença de células tumorais com atividade proliferativa (CUMMINS et al. 2006; MARKOVIC et al. 2007). Em nosso estudo, predominou tumores em fase de crescimento vertical, já que nos ativemos nos tumores com espessura igual ou maior que 1 mm.

O Índice de Breslow é o fator clínico-patológico prognóstico mais amplamente utilizado. Por esse índice, cuja acurácia é maior que os índices de Clark, o prognóstico do melanoma é associado à espessura do tumor que, por sua vez, apresenta correlação inversa com a sobrevida do paciente. Melanomas primários com espessura de até 1 mm estão associados a uma taxa muito baixa de metástases à distância e de morte por melanoma, além de uma baixa taxa de metástase local ou reincidência regional. Essas taxas são maiores em melanomas com espessura maior que 1 mm (MARKOVIC et al. 2007; PAYETTE et al. 2009; GONZALEZ et al. 2010). Nesta amostra de melanomas com espessura igual ou maior que 1 mm foi observada taxa de recidiva de 37,3%. A taxa de morte por melanoma foi de 10,5%.

Os índices de Clark se referem a cinco níveis de invasão tumoral nas camadas da pele que foram associados com sobrevida (CLARK et al. 1969), e indivíduos com índice de Clark a partir de 3 apresentam pior prognóstico (MARKOVIC et al. 2007). Nesta amostra, 96,5% dos pacientes apresentavam tumores com índice de Clark igual ou maior que 3, mas não foi escopo do estudo a identificação de correlações entre parâmetros clínico-histológicos e a evolução do paciente, motivo pelo qual não pudemos ratificar essa assertiva da literatura.

O índice mitótico tende a ser maior nos tumores biologicamente mais agressivos (SCOLYER et al. 2011). A maioria dos tumores avaliados neste estudo apresentaram índice mitótico inferior a 5/10CGA (65,5%), e pudemos observar correlação positiva fraca e não significativa entre a espessura dos tumores e respectivos índices mitóticos ($r = 0,30$). Outro dado não apresen-

tado em nossos resultados, uma vez que não foi nosso objetivo identificar associações entre esses parâmetros, mas que mereceu análise à parte, é que não houve diferenças significativas nos índices mitóticos quando comparados os melanomas superficiais (média de 4,3/10CGA), os nodulares (média de 7,7/10CGA) e os acrais (média de 4,8/10CGA), ainda que a média desses índices tenha se mostrado maior nos melanomas nodulares.

A presença de ulceração é definida como a perda de continuidade do tecido epidérmico na superfície de um tumor primário. Pode ser vista tanto macroscopicamente quanto ao exame microscópico de cortes histológicos. Em 2002, a presença de ulceração foi inserida na classificação do AJCC dentre os critérios histológicos que influenciam o prognóstico de pacientes com melanoma. Embora seja considerada fator preditivo independente, é frequentemente relacionada com a espessura do tumor (MARKOVIC et al. 2007). Em nosso estudo, foi observada presença de ulceração em 30,9% dos casos, o que, segundo a literatura, estaria indicando bom prognóstico para os demais 69,1%. Novamente extrapolando os objetivos deste estudo e acrescentando dados não apresentados nos resultados, dentre os 17 casos com presença de ulceração, nove (52,9%) apresentaram recidivas e três (17,6%) faleceram pelo melanoma. Por outro lado, dentre os 38 casos sem evidências de ulceração, 11 (28,9%) apresentaram recidivas e três (7,9%) evoluíram para óbito. Em simples observação dessas frequências, poderíamos inferir que a presença de ulceração praticamente dobrou a possibilidade de ocorrência de recidivas e óbitos em nossa amostra.

Não houve qualquer caso de regressão do tumor observado neste es-

tudo, o que nos impede de comentar as assertivas da literatura, segundo as quais presença de regressão estaria associada com pior sobrevida (PAYETTE et al. 2009). Também foram baixas as frequências de satelitoses (3,3%) e de invasão linfática (8,2%) observadas neste estudo, achados que têm sido associados com pior prognóstico (GARBE et al. 2011). Mesmo considerando que nossas investigações estavam voltadas para tumores mais espessos, não identificamos nenhum caso de invasão hematogênica que, de toda forma, parece estar relacionada com a espessura do tumor e com ocorrência de metástase (MARKOVIC et al. 2007).

Pesquisa positiva do linfonodo sentinela estava registrada para 18 pacientes (31,0%), dentre os 58 prontuários em que havia a informação sobre realização de biópsia disponibilizada. Por outro lado, 33 pacientes foram submetidos à linfadenectomia.

As indicações atuais para pesquisa de linfonodo sentinela incluem lesões primárias com espessura maior que 0,76 mm; espessura menor que 0,76 mm, desde que associada a Clark IV e/ou ulceração e/ou sinais de regressão (PRIETO 2010). Fase de crescimento vertical e índice mitótico estão sendo considerados por alguns autores, mas ainda não é consensual (WAINSTEIN e BELFORT 2004). Considerando, ainda, que metástases em casos de melanoma podem ocorrer pelas vias hematogênica ou linfática, e que cerca de dois terços das metástases são confinados ao linfonodo regional, desde 2001 a biópsia do linfonodo sentinela vem sendo considerada cada vez mais amplamente conduta de rotina na maioria dos grandes centros, já que é essencial para o estadiamento da doença, segundo a classificação do

AJCC (BALCH et al. 2009; GARBE et al. 2011). Certamente, o fato de ter sido realizada biópsia do linfonodo sentinela em todos os 58 pacientes cujos prontuários indicavam a informação se deve a esses conhecimentos e indicações da literatura.

Todos os 18 pacientes com pesquisa positiva para linfonodo sentinela foram submetidos à linfadenectomia terapêutica, conforme recomendações da literatura para que esse procedimento seja efetuado sempre que houver linfonodo clinicamente suspeito ou histologicamente comprovado (WAINSTEIN e BELFORT 2004). A linfadenectomia ainda é o tratamento de escolha em pacientes que apresentam micrometástases diagnosticadas em biópsia do linfonodo sentinela, linfonodos palpáveis e em pacientes com lesões com espessura maior que 4 mm sem evidência de acometimento de linfonodo, pois nesses pacientes a incidência de metástase linfonodal pode ser de 60%-70% (GARBE et al. 2011).

As linfadenectomias eletivas podem ser indicadas em casos nos quais há alguma impossibilidade para a pesquisa do linfonodo sentinela ou mediante a impossibilidade de seguimento ambulatorial adequado, desde que haja definição para apenas uma estação linfonodal em pacientes com idade inferior a 60 anos que apresentem lesão primária com espessura maior que 1,0 mm, não ulcerada e superposta à estação de drenagem linfática (PRIETO 2010). A realização de linfadenectomia aparentemente eletiva nos 15 casos de nossa amostra cuja pesquisa do linfonodo sentinela se mostrou negativa pode ser explicada por esses critérios que fundamentam a sua indicação, especialmente se considerarmos que nosso estudo incluiu apenas

tumores com espessura igual ou maior que 1 mm.

Com relação ao objetivo mais específico deste estudo, os achados imuno-histoquímicos revelaram expressão de c-IAP-1 em 71,2% das amostras analisadas; expressão de XIAP em 93,9%; expressão de Survivina em 23,4%; e expressão de Smac/Diablo em 84,6%).

Essas proteínas fazem parte da família de proteínas intracelulares inibidoras de apoptose (IAPs), dentre as quais a XIAP tem sido a mais intensamente estudada, já que sua expressão tem se mostrado elevada em neoplasias, o que a torna um alvo promissor para as terapias antineoplásicas (DUCKETT 2005; GALBÁN et al. 2009), por meio da sensibilização das células cancerosas aos agentes indutores de apoptose (ARORA et al. 2007). Estudos demonstraram a presença de XIAP tanto em melanócitos normais quanto nos neoplásicos, nos quais foi também associada com resistência a regimes quimio e a radioterapêuticos (KLUGER et al. 2007).

De fato, a expressão de XIAP foi observada em 93,9% das amostras deste estudo com melanomas com espessura igual ou maior que 1 mm. Essa alta frequência de expressão da XIAP não permitiu incluí-la nas análises de sobrevida que serão comentadas mais adiante.

Sabe-se que a XIAP se expressa em alto nível quando as proteínas centrais mediadoras de apoptose estão inibidas, o que leva as células malignas a escaparem da morte celular programada, potencializando o crescimento e a sobrevida do tumor (EMANUEL et al. 2008). Todavia, deve-se ressaltar que ainda não existem estudos de coorte que avaliem os níveis de expressão de XIAP em amostras de pacientes com melanoma a partir de

critérios mais cuidadosos (KLUGER et al. 2007).

A propriedade inibidora da caspase por XIAP pode ser neutralizada por Smac/Diablo, que é uma proteína mitocondrial liberada no citosol devido à permeabilização das membranas mitocondriais. A ligação com Smac/Diablo pode deslocar a XIAP através da interação, liberação da caspase e diminuição do limiar celular para apoptose, interferindo na sua atividade de execução (DUCKETT 2005). CREAGH et al. (2004) e WILKINSON et al. (2004) observaram que as IAPs neutralizam a Smac/Diablo, o que reprime as atividades intrínsecas da ubiquitina ligase dessas proteínas.

Expressão de Smac/Diablo foi positiva em 84,6% das amostras deste estudo. No entanto, ainda é controversa a relação entre Smac/Diablo e melanoma. Embora já tenham sido encontrados altos níveis de caspase 3 e de Smac/Diablo e baixos níveis de XIAP em células com melanoma, ainda não está claro se é o bloqueio da XIAP e de outras IAPs pelo Smac ou mesmo por outras proteínas liberadas pelas mitocôndrias o que leva à liberação das caspases (ZHANG et al. 2001).

Já foi encontrada ampla expressão de Survivina em diferentes tipos de câncer (ARORA et al. 2007), e essa proteína parece exercer papel relevante tanto no controle de mitose e citocinese quanto no alinhamento cromossômico durante a mitose (PIRAS et al. 2007; THOMAS et al. 2007). Imunoreatividade para Survivina citoplasmática tem sido relacionada com pior prognóstico em grande quantidade de tumores humanos (PIRAS et al. 2007), e parece que a superexpressão dessa proteína é mais importante na inibição da apoptose do que na ativação de proliferação celular (THOMAS et

al. 2007; PIRAS et al. 2007).

A expressão de Survivina tem sido observada em pacientes com melanoma tanto primário quanto metastático (PIRAS et al. 2007), e, ao contrário de outros inibidores da apoptose, não se expressa em melanócitos. THOMAS et al. (2007) detectaram expressão de Survivina em cerca de 85% de melanomas localizados e 100% de melanomas metastáticos. Nossos achados com relação à Survivina corroboram os dados da literatura, já que houve expressão dessa proteína em 76,19% das amostras analisadas.

Por fim, não encontramos qualquer associação significativa entre a expressão das proteínas estudadas e a sobrevida câncer-específica ou livre da doença em cinco anos.

Ainda estão em estudo os níveis de expressão dessas proteínas que norteiem melhor as pesquisas sobre sua relação com os melanomas, o que certamente permitiria outros níveis de associações com parâmetros clínicos e histopatológicos. De toda forma, para melhor compreensão dos achados deste estudo, futuramente ampliaremos os objetivos de nossa pesquisa para tentar identificar eventuais associações entre esses parâmetros e a expressão das proteínas inibidoras de apoptose aqui avaliadas.

7 CONCLUSÃO

Não houve associação significativa entre a expressão das proteínas c-IAP2, XIAP, Survivina e Smac/Diablo e a sobrevida câncer-específica e livre da doença dos pacientes em cinco anos.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alonso SR, Ortiz P, Pollán M, et al. Progression in cutaneous malignant melanoma is associated with distinct expression profiles: a tissue microarray-based study. **Am J Pathol** 2004; 164:193-203.

Andrade VP, Cunha IW, Silva EM, et al. O arranjo em matriz de amostras teciduais (tissue microarray): larga escala e baixo custo ao alcance do patologista. **J Bras Patol Med Lab** 2007; 43:55-60.

Anger M. **Expressão de proteínas da apoptose em melanoma cutâneo primário**. São Paulo; 2008. [Tese de Doutorado-Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo].

Arora V, Cheung HH, Plenchette S, Micali OC, Liston P, Kornelux RG. Degradation of Survivin by the X-linked Inhibitor of Apoptosis (XIAP)-XAF1 Complex. **J Biol Chem** 2007; 282:26202-9.

Assunção Guimarães C, Linden R. Programmed cell deaths. Apoptosis and alternative death styles. **Eur J Biochem** 2004; 271:1638-50.

Balch CM. Microscopic satellites around a primary melanoma: another piece of the puzzle in melanoma staging. **Ann Surg Oncol** 2009; 16:1092-4.

Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, et al. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. **J Clin Oncol** 2009; 27:6199-206.

Bandarchi B, Ma L, Navab R, Seth A, Rasty G. From melanocyte to metastatic malignant melanoma. **Dermatol Res Pract** 2010; 2010. pii: 583748. [Epub 2010 Aug 11].

Bowen AR, Hanks AN, Allen SM, Alexander A, Diedrich MJ, Grossman D. Apoptosis regulators and responses in human melanocytic and keratinocytic cells. **J Invest Dermatol** 2003; 120:48-55.

Brandão MAR, Souza FFA, Zanvettor P. Clinical, demographic and histopathological evaluation of 529 melanoma cases diagnosed in the state of Bahia, Brazil. **Appl Cancer Res Suppl** 2005; (1):9-10.

Breslow A. Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. **Annals Surg** 1970; 172:902-8.

Cascinelli N, Zurrada S, Galimberti V, et al. Acral lentiginous melanoma: a histological type without prognostic significance. **J Dermatol Surg Oncol** 1994; 20:817-22.

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

Costache M, Simionescu O, Sajin M, et al. Apoptosis in cutaneous melanomas. **Rom J Morphol Embryol** 2007; 48:343-7.

Csomos RA, Brady GF, Duckett CS. Enhanced cytoproliferative effects of the inhibitor of apoptosis protein cellular IAP1 through stabilization with TRAF2. **J Biol Chem** 2009; 284:20531-9.

Creagh EM, Murphy BM, Duriez PJ, Duckett CS, Martin SJ. Smac/Diablo antagonizes ubiquitin ligase activity of inhibitor of apoptosis proteins. **J Biol Chem** 2004; 279:26906-14.

Cress RD, Holly EA. Incidence of cutaneous melanoma among non-Hispanic whites, Hispanics, Asians, and blacks: an analysis of california cancer registry data, 1988-93. **Cancer Causes Control** 1997; 8:246-52.

Cummins DL, Cummins JM, Pantle H, Silverman MA, Leonard AL, Chanmugam A. Cutaneous malignant melanoma. **Mayo Clin Proc** 2006; 81:500-7.

Degterev A, Yuan J. Expansion and evolution of cell death programmes. **Nat Rev Mol Cell Biol** 2008; 9:378-90.

Duckett SC. IAP proteins: sticking it to Smac. **J Biol Chem** 2005; 385:e1-2.

Emanuel POM, Phelps RG, Mudgil A, Shafir M, Burstein DE. Immunohistochemical detection of XIAP in melanoma. **J Cutan Pathol** 2008; 35:292-7.

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 Dermatol** 2008; 128:196-202.

Ferrari Júnior NM, Muller H, Ribeiro M, Maia M, Sanches Júnior JA. Cutaneous melanoma: descriptive epidemiological study. **Sao Paulo Med J** 2008; 126:41-7.

Galbán S, Hwang C, Rumble JM, et al. Cytoproliferative effects of IAPs revealed by small molecule antagonist. **Biochem J** 2009; 417:765-71.

Garbe C, Eigentler TK, Bauer J, et al. Histopathological diagnostics of malignant melanoma in accordance with the recent AJCC classification 2009: Review of the literature and recommendations for general practice. **J Dtsch Dermatol Ges** 2011; 9:690-9.

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

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

Goodson AG, Grossman D. Strategies for early melanoma detection: approaches to the patient with nevi. **J Am Acad Dermatol** 2009; 60:719-35.

Gonzalez, RJ, Kudchadkar R, Rao NG, Sondak VK. Adjuvant immunotherapy and radiation in the management of high-risk resected melanoma. **Ochsner J** 2010; 10:108-16.

Haack RL, Horta BL, Cesar JA. Queimadura solar em jovens: estudo de base populacional no sul do Brasil. **Rev Saúde Pública** 2008; 42:26-33.

Hengartner M. The biochemistry of apoptosis. **Nature** 2000; 407:770-6.

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

Hussein MR, Haemel AK, Wood GS. Apoptosis and melanoma: molecular mechanism. **J Pathol** 2003; 199:275-88.

Ivan D, Prieto VG. Use of immunohistochemistry in the diagnosis of melanocytic lesions: applications and pitfalls. **Future Oncol** 2010; 6(7):1163-75.

Kalkhoran S, Milne O, Zalaudek I, et al. Historical, clinical, and dermoscopic characteristics of thin nodular melanoma. **Arch Dermatol** 2010; 146:311-8.

Kaladi MK, White RR, Johnson JL, Tyler DS, Seigler HF. Thin melanoma: predictive lethal characteristics from a 30-year clinical experience. **Ann Surg** 2003; 238:528-37; discussion 535-7.

Kluger HM, McCarthy MM, Alvero AB, et al. The X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) is up-regulated in metastatic melanoma, and XIAP cleavage by phenoxogiol is associated with carboplatin sensitization. **J Translation Med** 2007; 5:6-21.

Kudchadkar R. Novel targeted therapies for the treatment of metastatic melanoma. **Ochsner J** 2010; 10:117-24.

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

Lages RB, Vieira SC, Abreu BAL, Rodrigues INL, Santos LG, Cordeiro NM. Sentinel lymph node biopsy in cases of skin melanoma: initial experiences at a center in Northeastern Brazil. **An Bras Dermatol** 2011; 86:379-82.

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.

Liu T, Biddle D, Hanks AN, et al. Activation of dual apoptotic pathways in human melanocytes and protection by surviving. **J Invest Dermatol** 2006; 126:2247-56.

Mackie RM, Hauschild A, Eggermont MM. Epidemiology of invasive cutaneous melanoma. **Ann Oncol** 2009; 29:1-7.

Markovic SN, Erickson LA, Rao RD, et al. Malignant melanoma in the 21st Century, Part 1: epidemiology, risk factors, screening, prevention, and diagnosis. **Mayo Clin Proc** 2007; 82:364-80.

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.

Payette MJ, Katz M, Grant-Kels JM. Melanoma prognostic factors found in the dermatopathology report. **Clin Dermatol** 2009; 27:53-74.

Piras F, Murtas D, Minerba L, et al. Nuclear survivin is associated with disease recurrence and poor survival in patients with cutaneous malignant melanoma. **Histopathology** 2007; 50:835-42.

Prieto VG. Sentinel lymph nodes in cutaneous melanoma: handling, examination, and clinical repercussion. **Arch Pathol Lab Med** 2010; 134:1764-9.

Raj D, Liu T, Samadashwily G, Li F, Grossman D. Survivin repression by p53, Rb, and E2F2 in normal human melanocytes. **Carcinogenesis** 2008; 29:194-201.

Reed RJ. **New concepts in surgical pathology of the skin**. New York: Wiley; 1976. Acral lentiginous melanoma; p.89-90.

Riker AI, Zea N, Trinh T. The epidemiology, prevention, and detection of melanoma. **Ochsner J** 2010; 10:56-65.

Sánchez-Yus E, Herrera M, Simón RS, Requena L. [But... Was there ever a Clark classification of melanomas?] **Actas Dermosifiliogr** 2010; 101:19-30.

Scolyer RA, Long GV, Thompson JF. Evolving concepts in melanoma classification and their relevance to multidisciplinary melanoma patient care. **Molecular Oncol** 2011; 124:3-6.

Silke J, Kratina T, Chu D, et al. Determination of cell survival by ring-mediated regulation of inhibitor of apoptosis (IAP) protein abundance. **Proc Natl Acad Sci USA** 2005; 102:16182-7.

Souza SRP, Fisher FM, Souza JMP. Suntanning and risk of cutaneous melanoma: a literature review. **Rev Saúde Pública** 2004; 38:1-11.

Srinivasula SM, Datta P, Fan XJ, Fernandes-Alnemri T, Huang Z, Alnemri ES. Molecular determinants of the caspases-promoting activity of smac/Diablo and role in the death receptor pathway. **J Biol Chem** 2000; 275:36152-7.

Thomas J, Liu T, Cotter MA, et al. Melanocytes expression of survivin promotes development and metastasis of UV-induced melanoma in HGF-transgenic mice. **Cancer Res** 2007; 67:5172-8.

Tsao H, Atkins MB, Sober AJ. Management of cutaneous melanoma. **N Engl J Med** 2004; 351:998-1012.

Tucker MA. Melanoma epidemiology. **Hematol Oncol Clin North Am** 2009; 23:383-95, vii.

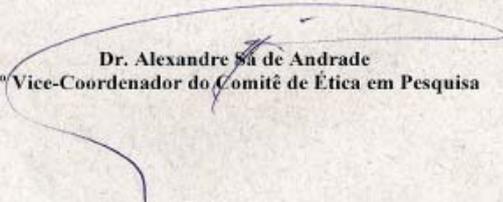
Wainstein AJA, Belfort FA. Conduta para o melanoma cutâneo. **Rev Col Bras Cir** 2004; 31:204-14.

Wilkinson JC, Wilkinson A, Scott FL, Csomos RA, Salvesen GS, Duckett CS. Neutralization of Smac/Diablo by inhibitors of apoptosis (IAPs). **J Biol Chem** 2004; 279:51082-90.

Wu G, Chai J, Suber TL, et al. Structural basis of IAP recognition by Smac/Diablo. **Nature** 2000; 408:1008-12.

Zhang XD, Zhang XY, Gray CP, Nguyen T, Hersey P. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-inducing apoptosis of human melanoma is regulated by Smac/Diablo release from mitochondria. **Cancer Res** 2001; 61:7339-48.

Anexo 1 - Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.

 Hospital A.C. Camargo <small>Centro de Tratamento, Ensino e Pesquisa em Câncer</small>	Comitê de Ética em Pesquisa - CEP
<p>São Paulo, 21 de Maio de 2010.</p>	
<p>Ao Dr. Gilles Landman</p>	
<p>Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 1413/10 “Estudo da expressão das proteínas inibidoras da apoptose em melanomas primários com ou sem micrometástases em linfonodos sentinela”.</p>	
<p>Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente – Hospital do Câncer - A.C. Camargo/SP, em sua última reunião de 11/05/2010, <u>aprovaram</u> a realização do projeto em referência e tomaram conhecimento dos seguintes documentos:</p>	
<ul style="list-style-type: none">➤ Folha de Rosto para Pesquisa Envolvendo Seres Humanos;➤ Termo de Compromisso do Pesquisador com as Resoluções do Conselho Nacional de Saúde;➤ Termo de Dispensa do Consentimento Livre e Esclarecido;➤ Orçamento Financeiro Detalhado;➤ Declaração de Ciência do Departamento de Oncologia Cutânea;➤ Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Anatomia Patológica.	
<p>Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhadas à assistente do CEP dentro de 12 meses.</p>	
<p>Atenciosamente,</p>	
<p style="text-align: center;"> Dr. Alexandre Sa de Andrade 2º Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa</p>	
<p style="text-align: right;">1/1</p>	
<hr/> <p style="text-align: center;">Fundação Antonio Prudente – CNPJ/MF N. 60.961.968/0001-06 Rua Prof. Antônio Prudente, 211 – Liberdade – São Paulo, SP – 01509-900 Telefone: (11) 2189-5000 www.accamargo.org.br</p>	

Anexo 2 - Dados clínico-demográficos de 63 pacientes com melanomas primários com espessura igual ou maior que 1 mm.

Casos	Iniciais	Gênero	Idade	Antecedentes pessoais	Antecedentes familiares
1	LB	Masc	65	NI	NI
2	GZC	Fem	59	NI	NI
3	ITLS	Fem	61	NI	NI
4	JSC	Masc	59	NI	NI
5	AZG	Fem	63	Não	NI
6	ACZ	Fem	47	Não	Não
7	OCLG	Masc	99	NI	NI
8	PBFP	Masc	47	NI	NI
9	AFS	Fem	85	NI	NI
10	EB	Masc	85	NI	NI
11	JMZ	Masc	47	Não	Sim
12	RCS	Fem	27	NI	NI
13	KP	Fem	27	NI	NI
14	JTT	Masc	61	NI	NI
15	JNS	Fem	21	Não	Não
16	MPF	Fem	66	NI	NI
17	JTU	Fem	51	Não	Não
18	JF	Masc	24	Não	Não
19	MASF	Masc	44	NI	NI
20	PAS	Masc	69	NI	NI
21	SPA	Masc	68	Não	Não
22	VSS	Fem	43	Não	Não
23	BBB	Fem	71	Não	Não
24	LLF	Masc	38	Não	Não
25	LCB	Masc	57	Não	Não
26	ABS	Fem	64	Não	Não
27	GFJS	Masc	73	Não	Não
28	ACF	Masc	31	Não	Não
29	JRN	Masc	49	NI	NI
30	NS	Masc	54	Não	Não
31	AM	Masc	81	NI	NI
32	CMC	Fem	70	NI	NI
33	APN	Masc	53	Não	Não
34	CAAP	Masc	52	Não	Não
35	NRC	Masc	54	NI	NI
36	LLZA	Fem	37	Não	Não
37	MSTV	Masc	51	NI	NI
38	NMZ	Fem	65	NI	NI
39	MFGG	Fem	48	Não	Não
40	AF	Masc	58	Não	Não
41	LCFB	Masc	48	NI	NI
42	GMS	Masc	43	NI	NI
43	SRS	Fem	53	NI	NI
44	ONSF	Fem	58	NI	NI
45	KY	Masc	66	Não	Não
46	AB	Masc	83	Não	Não
47	CJ	Fem	80	Não	Não
48	DLM	Masc	56	NI	NI
49	MAK	Fem	67	NI	NI
50	CEF	Masc	53	NI	NI
51	SSM	Masc	59	Não	Não
52	SMM	Fem	43	Não	Não
53	JLMV	Fem	43	Não	Não
54	GCG	Masc	71	Não	Não
55	JFPO	Fem	25	Não	Não
56	VRSC	Fem	42	Não	Não
57	JIC	Masc	32	Não	Não
58	CMMS	Fem	45	NI	NI
59	SAA	Masc	67	Sim	Sim
60	DHM	Fem	67	NI	NI
61	LBG	Masc	69	NI	NI
62	ALC	Fem	78	NI	NI
63	CHB	Fem	99	NI	NI

Anexo 3 - Dados histológicos de tecido tumoral de 63 pacientes com melanomas primários com espessura igual ou maior que 1mm (parte 1).

Casos	Local	Tipo histológico	Espessura	Crescimento	Clark	Mitoses (/10CGA)
1	Tronco	Nodular	4,30	Vertical	III	21
2	Membros inferiores	Nodular	3,20	Vertical	III	7
3	NI	Superficial	1,70	Vertical	III	9
4	Tronco	Nodular	3,80	Vertical	IV	4
5	Membros inferiores	Nodular	3,40	Vertical	IV	4
6	Membros inferiores	Superficial	2,40	Vertical	IV	4
7	NI	NI	1,00	NI	NI	NI
8	Tronco	Superficial	1,60	Vertical	III	3
9	Planta do pé	Acral	14,00	Vertical	V	11
10	Planta do pé	Superficial	1,00	Vertical	III	NI
11	Membros inferiores	Superficial	1,20	radial	III	1
12	Tronco	Superficial	1,40	Vertical	III	1
13	Membros inferiores	Superficial	1,10	Vertical	III	3
14	Planta do pé	Acral	1,40	Vertical	III	7
15	Membros inferiores	NI	1,00	NI	NI	0
16	Membros inferiores	Superficial	1,00	Vertical	II	1
17	Membros superiores	Superficial	1,10	Vertical	III	5
18	Pescoço	Superficial	1,85	Vertical	III	1
19	NI	Superficial	1,00	NR	NI	NI
20	Planta do pé	Acral	2,10	Vertical	IV	NI
21	Membros superiores	Superficial	2,50	Vertical	IV	3
22	NI	Superficial	1,00	NI	III	NI
23	Cabeça	Nodular	5,20	Vertical	IV	6
24	Membros inferiores	Nodular	3,80	Vertical	V	6
25	Membros inferiores	Outros	6,50	Vertical	IV	5
26	Membros inferiores	Superficial	2,75	Vertical	IV	18
27	Tronco	Outros	6,20	Vertical	IV	6
28	Cabeça	Superficial	2,20	Vertical	IV	2
29	Tronco	Superficial	2,30	Vertical	III	3
30	Tronco	Superficial	6,50	Vertical	IV	0
31	Planta do pé	Superficial	3,55	Vertical	IV	5
32	Membros inferiores	Nodular	8,50	NI	V	1
33	Tronco	Superficial	7,50	Vertical	IV	8
34	Planta do pé	Acral	2,80	Vertical	IV	4
35	Tronco	NI	1,60	Vertical	III	1
36	Membros superiores	Superficial	1,00	Vertical	III	0
37	Tronco	Superficial	1,00	radial	II	0
38	Membros inferiores	Superficial	1,10	Vertical	III	0
39	Membros inferiores	Nodular	3,00	Vertical	III	2
40	Membros superiores	Nodular	6,80	Vertical	V	19
41	Cabeça	Superficial	2,20	Vertical	IV	3
42	Cabeça	Superficial	1,50	Vertical	III	13
43	Membros superiores	Superficial	1,50	Vertical	IV	1
44	Cabeça	Superficial	9,70	Vertical	V	6
45	Membros inferiores	Acral	5,70	Vertical	III	1
46	Membros superiores	Nodular	4,30	Vertical	IV	6
47	Tronco	Superficial	2,60	Vertical	III	11
48	Tronco	Superficial	1,00	Vertical	III	1
49	Tronco	Superficial	2,20	Vertical	IV	3
50	Tronco	Superficial	1,00	Vertical	III	3
51	Membros inferiores	Superficial	1,15	Vertical	III	5
52	Membros superiores	Superficial	2,30	Vertical	III	15
53	Membros superiores	Acral	3,80	Vertical	NI	0
54	Outras	Acral	4,20	Vertical	NI	8
55	Tronco	Superficial	1,20	Vertical	III	7
56	Membros superiores	Superficial	3,00	Vertical	III	10
57	Tronco	Nodular	5,60	Vertical	NI	9
58	Membros inferiores	Superficial	1,50	Vertical	III	2
59	Membros inferiores	Superficial	3,60	Vertical	IV	2
60	Tronco	Superficial	1,30	Vertical	III	0
61	Membros superiores	Superficial	1,30	Vertical	III	1
62	Planta do pé	Acral	2,35	Vertical	IV	3
63	NI	Superficial	1,00	Vertical	III	4

Anexo 4 - Dados histológicos de tecido tumoral de 63 pacientes com melanomas primários com espessura igual ou maior que 1mm (parte 2).

Casos	Ulceração	Regressão	Invasão sanguínea	Invasão linfática	Satelitoses
1	Sim	Não	Não	Não	Não
2	Não	Não	Não	Não	Não
3	Não	Não	Não	Não	Não
4	Sim	Não	Não	Não	Não
5	Não	Não	Não	Não	Não
6	Não	Não	Não	Não	Não
7	NI	NI	NI	NI	NI
8	Não	Não	Não	Não	Não
9	Sim	Não	Não	Sim	Sim
10	Não	Não	Não	Não	Não
11	Sim	Não	Não	Não	Não
12	Não	Não	Não	Não	Não
13	Não	Não	Não	Não	Não
14	Sim	Não	Não	Não	Não
15	NI	Não	Não	Não	Não
16	Não	Não	Não	Não	Não
17	Não	Não	Não	Não	Não
18	Não	Não	Não	Não	Não
19	Não	Não	Não	Não	Não
20	Não	Não	Não	Não	Não
21	Não	Não	Não	Não	Não
22	NI	NI	NI	NI	NI
23	Sim	Não	Não	Não	Não
24	NI	Não	Não	Não	Não
25	Sim	Não	Não	Não	Sim
26	Sim	Não	Não	Sim	Não
27	NI	Não	Não	Não	Não
28	Não	Não	Não	Não	Não
29	Não	Não	Não	Não	Não
30	Não	Não	Não	Não	Não
31	Não	Não	Não	Não	Não
32	NI	Não	Não	Não	Não
33	Sim	Não	Não	Sim	Não
34	Não	Não	Não	Não	Não
35	Não	Não	Não	Não	Não
36	Não	Não	Não	Não	Não
37	Não	Não	Não	Não	Não
38	NI	Não	Não	Não	Não
39	Sim	Não	Não	Não	Não
40	Sim	Não	Não	Não	Não
41	Não	Não	Não	Não	Não
42	Não	Não	Não	Não	Não
43	Não	Não	Não	Não	Não
44	Não	Não	Não	Sim	Não
45	Não	Não	Não	Não	Não
46	Sim	Não	Não	Não	Não
47	Sim	Não	Não	Não	Não
48	Sim	Não	Não	Não	Não
49	Não	Não	Não	Não	Não
50	Não	Não	Não	Não	Não
51	Não	Não	Não	Não	Não
52	Não	Não	Não	Não	Não
53	NI	Não	Não	Não	Não
54	Sim	Não	Não	Não	Não
55	Sim	Não	Não	Não	Não
56	Não	Não	Não	Não	Não
57	Sim	Não	Não	Não	Não
58	Não	Não	Não	Não	Não
59	Não	Não	Não	Sim	Não
60	Não	Não	Não	Não	Não
61	Não	Não	Não	Não	Não
62	Não	Não	Não	Não	Não
63	Não	Não	Não	Não	Não

Anexo 5 - Dados de disseminação tumoral de 63 pacientes com melanomas primários com espessura igual ou maior que 1mm.

Casos	Localização do linfonodo sentinela	Linfadenectomia	Linfonodos retirados	Linfonodos positivos
1	-	Sim	47	8
2	Inguinal E	Sim	15	5
3	-	Sim	11	3
4	-	Sim	55	9
5	Inguinal E	Sim	10	5
6	Inguinal D	Sim	8	0
7	NI	NI	NI	NI
8	Axilar E	Não	-	-
9	-	Sim	10	4
10	Inguinal E	Não	0	0
11	Inguinal D	Sim	19	0
12	Inguinal D	Sim	13	0
13	Axilar E	Não	0	0
14	Inguinal D	Sim	11	0
15	NI	Sim	29	4
16	Inguinal D	Não	-	-
17	Axilar D	Não	-	-
18	Axilar E	Não	0	0
19	-	Sim	24	7
20	-	Sim	4	1
21	Axilar D	Não	-	-
22	Inguinal D	Não	0	0
23	-	Não	0	0
24	Inguinal E	Não	-	-
25	-	Sim	NI	NI
26	-	Sim	34	5
27	Axilar E	Não	0	0
28	Cervical D	Sim	32	0
29	Axilar D	Não	-	-
30	-	Sim	74	1
31	Inguinal D	Não	-	-
32	Inguinal D	Sim	12	3
33	Inguinal D	Sim	11	0
34	Inguinal D	Não	-	-
35	Axilar D	Não	-	-
36	Axilar E	Não	0	0
37	Axilar E	Sim	49	0
38	Inguinal D	Não	-	-
39	Inguinal E	Sim	11	0
40	Axilar D	Sim	40	0
41	-	Sim	51	6
42	Axilar D	Não	-	-
43	Axilar E	Não	-	-
44	Cervical D	Sim	6	1
45	Inguinal D	Não	-	-
46	Axilar D	Sim	52	0
47	Axilar E	Não	0	0
48	Cervical D	Não	0	0
49	Axilar D	Não	-	-
50	Axilar D	Sim	22	1
51	Axilar D	Não	-	-
52	Axilar D	Não	-	-
53	Axilar D	NI	NI	NI
54	Axilar E	Sim	24	6
55	Inguinal E	Sim	10	0
56	Axilar D	Sim	25	0
57	Axilar E	Sim	12	0
58	Inguinal E	Sim	9	0
59	NI	NI	NI	NI
60	Axilar E	Não	0	0
61	Axilar D	Sim	31	0
62	Inguinal E	Sim	8	1
63	NI	NI	NI	NI

Anexo 6 - Dados da evolução de 63 pacientes com melanomas primários com espessura igual ou maior que 1mm.

Casos	Recidivas	Tempo (meses)	Local da recidiva	Seguimento (meses)	Evolução
1	Sim	13	Pele	15	Sobrevida sem doença
2	Sim	18	Pele	20	Sobrevida com doença
3	Sim	43	Pele	110	Sobrevida sem doença
4	Sim	1	Pele + SNC + Fígado + Ossos + Outros	5	Óbito pelo melanoma
5	Sim	21	Pele + Outros	24	Óbito pelo melanoma
6	Não	0		83	Sobrevida sem doença
7	NI	NI		NI	NI
8	Não	0		21	Sobrevida sem doença
9	Sim	NI	Pele	6	Sobrevida com doença
10	Não	0		51	Sobrevida sem doença
11	Não	0		80	Sobrevida sem doença
12	NI	NI		60	Sobrevida sem doença
13	Não	0		71	Sobrevida sem doença
14	Não	0		84	Sobrevida sem doença
15	NI	NI		2	Sobrevida com doença
16	Não	0		81	Sobrevida sem doença
17	Não	0		81	Sobrevida sem doença
18	Não	0		60	Sobrevida sem doença
19	Sim	NI	Pele + SNC + Fígado	27	Sobrevida com doença
20	Sim	NI		81	Sobrevida com doença
21	Não	0		81	Sobrevida sem doença
22	Não	0		81	Sobrevida sem doença
23	Sim	11	SNC + Outros	47	Óbito pelo melanoma
24	Sim	23	Pele	33	Sobrevida sem doença
25	Sim	NI	Outros	2	Óbito pelo melanoma
26	Sim	16	Pele + Outros	15	Sobrevida com doença
27	Não	0		75	Sobrevida sem doença
28	Não	0		60	Sobrevida com doença
29	Não	0		84	Sobrevida sem doença
30	Sim	10	Pele + Outros	25	Sobrevida com doença
31	Não	0		65	Sobrevida sem doença
32	Sim	NI	Pele + Outros	60	NI
33	Sim	5	Pele + Outros	60	NI
34	Não	0		71	Sobrevida sem doença
35	Não	0		60	Sobrevida com doença
36	Não	0		44	Sobrevida sem doença
37	Não	0		60	Sobrevida sem doença
38	Não	0		59	Sobrevida sem doença
39	Não	0		72	Sobrevida sem doença
40	Não	0		11	Sobrevida sem doença
41	Sim	10	Pele + Fígado	13	Sobrevida com doença
42	Sim	42	Pele	62	Sobrevida com doença
43	Não	0		64	Sobrevida sem doença
44	Sim	NI	Pele + Ossos	48	Óbito pelo melanoma
45	Não	0		58	Sobrevida sem doença
46	Não	0		19	Sobrevida sem doença
47	Sim	NI		64	Sobrevida com doença
48	Não	0		57	Sobrevida sem doença
49	Sim	34	SNC + Outros	36	Óbito pelo melanoma
50	Sim	15	Outros	28	Sobrevida com doença
51	Não	0		36	Sobrevida sem doença
52	Não	0		1	Sobrevida com doença
53	Não	0		1	Sobrevida sem doença
54	Não	0		58	Sobrevida sem doença
55	Sim	27	Outros	57	Sobrevida sem doença
56	Não	0		53	Sobrevida sem doença
57	Não	0		42	Sobrevida sem doença
58	Não	0		48	Sobrevida com doença
59	NI	NI		NI	NI
60	Sim	30	Outros	53	Sobrevida sem doença
61	Não	0		45	Sobrevida sem doença
62	Não	0		9	NI
63	NI	NI		NI	NI

Anexo 7 - Dados do estudo da expressão de proteínas inibidoras de apoptoses em melanomas com espessura igual ou maior que 1 mm.

Casos	c-IAP-2			XIAP			Survivina			Smac/Diablo		
	Intens.	%	Total	Intens.	%	Total	Intens.	%	Total	Intens.	%	Total
1	0	0	0	1	4	5	2	2	4	1	3	4
2	0	0	0	2	4	6	2	3	4	3	4	7
3			Perda	2	4	6	2	3	5	3	3	6
4	0	0	0			Perda	2	3	5			Perda
5	1	3	4			Perda			Perda	0	0	0
6	2	3	5	1	4	5	0	0	0	3	4	7
7	0	0	0	2	4	6	2	4	6	3	4	7
8	2	4	6	2	3	5	2	3	5	3	4	7
9	2	2	4	2	4	6			Perda	3	4	7
10	0	0	0	2	3	5	3	4	7	3	4	7
11			Perda			Perda	3	1	4			Perda
12			Perda			Perda	3	4	7			Perda
13			Perda			Perda	3	4	7			Perda
14	1	4	5	2	4	6	3	4	7	3	4	7
15	0	0	0	2	4	6	0	0	0	0	0	0
16	0	0	0	2	4	6	0	0	0	3	4	7
17	2	4	6	2	4	6	0	0	0	3	4	7
18	1	4	5	2	4	6	1	2	3	3	4	7
19	2	3	5	2	4	6	3	4	7	3	4	7
20	1	4	5	1	4	5	2	4	6	3	4	7
21			Perda			Perda	3	4	7			Perda
22	1	4	5	1	4	5	0	0	0			Perda
23	0	0	0	0	0	0	3	4	7	3	4	7
24	0	0	0	2	4	6	3	4	7	0	0	0
25			Perda			Perda	3	4	7	3	4	7
26			Perda			Perda	3	4	7	0	0	0
27	0	0	0	0	0	0	3	4	7	0	0	0
28	2	4	6	2	4	6	3	4	7	3	4	7
29	1	2	3	1	4	5	2	4	6	3	4	7
30	3	4	7	3	4	7	0	0	0	3	4	7
31	1	3	4	2	4	6	3	4	7	2	4	6
32			Perda			Perda	3	4	7			Perda
33	2	4	6	2	4	6	1	2	3	3	4	7
34			Perda			Perda	3	3	6			Perda
35			Perda			Perda	0	0	0			Perda
36	2	4	6	2	4	6			Perda	3	4	7
37	3	4	7	2	4	6	3	4	7	1	4	5
38	1	4	5	2	4	6	2	2	4	3	4	7
39	1	4	5	2	4	6			Perda	3	4	7
40			Perda	2	4	6	3	4	7	3	4	7
41	1	4	5	2	4	6			Perda	3	4	7
42			Perda			Perda	3	4	7	3	4	7
43			Perda	1	3	4	3	4	7	2	3	5
44	0	0	0	2	4	6	3	4	7	2	4	6
45	0	0	0	2	4	6	3	4	7	2	4	6
46	1	4	5	2	4	6	3	4	7	3	4	7
47	2	4	6	3	4	7	3	4	7	3	4	7
48	1	3	4	1	3	4	3	4	7	3	4	7
49	2	4	6	2	4	6	2	4	6	3	4	7
50			Perda			Perda	3	4	7			Perda
51	0	0	0	1	4	5			Perda	3	4	7
52	3	4	7	1	4	5	2	4	6	0	0	0
53	1	4	5	2	4	6	3	4	7	3	4	7
54	1	4	5	1	4	5	3	4	7	3	4	7
55			Perda			Perda	2	4	6			Perda
56	2	4	6	2	4	6			Perda	3	4	7
57	2	4	6	2	4	6	3	4	7	3	4	7
58	0	0	0	1	4	5	2	3	5	1	4	5
59			Perda	1	4	5	3	4	7	3	4	7
60			Perda			Perda	0	0	0			Perda
61	3	1	4	2	4	6	2	2	4	3	3	6
62			Perda			Perda	3	1	4	3	4	7
63			Perda	0	0	0	3	4	7	0	0	0