

ANNA ANTONIO GOMES

Este exemplar corresponde à versão final da Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Pós-Graduação Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, para obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas, Área de Anatomia Patológica da **aluna Anna Antonio Gomes**.

Campinas, 03 de dezembro de 2001.

Prof. Dr. Elémir Macedo de Souza
Orientador

***MORFOMETRIA DA UNIDADE DERMO-EPIDÉRMICA NA
CÚTIS CITRINA DE MILLAN E NA PELE NÃO-EXPOSTA***

CAMPINAS

2001

i

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

ANNA ANTONIO GOMES

***MORFOMETRIA DA UNIDADE DERMO-EPIDÉRMICA NA
CÚTIS CITRINA DE MILLAN E NA PELE NÃO-EXPOSTA***

*Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação
da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas para Obtenção do título de
Doutor em Ciências Médicas, área de Anatomia
Patológica.*

ORIENTADOR: PROF. DR. ELEMIR MACEDO DE SOUZA

CO-ORIENTADORA: PROFA. DRA. MARIA LETÍCIA CINTRA

CAMPINAS

2001

ii

UNICAMP BIBLIOTECA CENTRAL SEÇÃO CIRCULANTE

UNIDADE 2e
Nº CHAMADA T/UNICAMP
G585m
V _____ EX _____
TOMBO BCI 50488
PROC 16.837/02
C _____ DX _____
PREÇO R\$ 11,00
DATA 21/08/02
Nº CPD _____

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

CM00172550-3

BIB ID 255820

G585e m Gomes, Anna Antonio
Cutis citrina de Milian e sua variante atrófica em diferentes fototipos de caucasóides : estudo morfométrico da unidade dermo epidérmica na pele exposta e não - exposta ao sol / Anna Antonio Gomes. Campinas, SP : [s.n.], 2001.

Orientadores : Elemir Macedo de Souza, Maria Letícia Cintra
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Atrofia. 2. Foto envelhecimento. I. Elemir Macedo de Souza.
II. Maria Letícia Cintra. III. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Banca examinadora da tese de Doutorado

Orientador(a) : Prof.(a) Dr.(a)

Membros:

1. Profa. Dra. Miriam Nacagami Sotto
2. Prof. Dr. Maurício Mota de A. Alchome
3. Profa. Dra. Liliara Ap. L. de A. Andrade
4. Profa. Dra. Eliane Maria I. Amstalden
5. Prof. Dr. Elenir Macedo de Souza

Curso de pós-graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 03/12/01

20023315

Ao Anthony, eterno e amado esposo pelo apoio sempre incondicional e amor além das fronteiras físicas.

Ao Tonay e à Cacá, filhos amados por me aturar nas horas de maior sobrecarga e pelo apoio.

Ao Elemir Macedo de Souza, mentor onipresente, pela confiança depositada.

À Maria Letícia Cintra, mentora onipresente.

À Rosana Celestina Morandin, amiga de inestimável valor, nas horas mais precisas, na "digestão" da análise estatística.

À Silvania Pinheiro Rosa, colaboradora na seleção dos casos, por aceitar-me em seu ambulatório.

Ao Konradin Metze, pelas valiosas sugestões na metodologia.

Ao Luis Alberto Magna, cabeça iluminada na estatística.

À Erni Maria Mancini Cia, amiga e incentivadora.

À Maria do Carmo Machado da Silva e Elisabeth Justi Rodrigues, companheiras e orientadoras burocráticas.

A Adélia Maria Azzi de Mello, Amália Luiz, Siomara Zanini Barreira, Carlos Eduardo Rodrigues, ex- residentes do serviço de Dermatologia do Hospital Municipal Dr. Mário Gatti, pelo auxílio na coleta das biópsias.

A Ismael Venâncio e Guaracy da Silva Ribeiro, pelo preparo cuidadoso dos fragmentos.

À Geralda Domiciana Pádua, Marilúcia Ruggiero Martins e Fátima Neder, pela inestimável ajuda com o KS 300.

Ao Marco Antonio Gongora, artista na confecção das fotos e slides.

À Adriana Mozzine Moreira, pelos relatórios e compra de materiais.

À Márcia Cristina Fernandes, pela exaustiva datilografia e tabulação dos dados.

Ao Carlos Mandarin de Lacerda e Benedito de Campos Vidal, pelas valiosas orientações.

Ao Laboratório Stiefel, pela doação de 20 "punches" descartáveis de 5 mm.

A Capes e à Funcamp, pelo apoio financeiro.

Ao Departamento de Anatomia Patológica do HC- Unicamp, pela acolhida sempre carinhosa.

Aos pacientes do Ambulatório de Dermatologia do Hospital Municipal Dr. Mário Gatti e CS-I Amparo, pela colaboração e confiança depositada em nosso trabalho.

A Lady Lee, Kissy Lee, Funny Lee e Bobby Lee, meus queridos cãesinhos, sempre comigo, solidários a qualquer hora do dia ou das noites de trabalho solitário.

Ao Senhor do Universo, pela força de prosseguir.

	PÁG
RESUMO.....	<i>xii</i>
1. INTRODUÇÃO.....	16
1.1. Fotoenvelhecimento versus envelhecimento cronológico.....	17
1.2. Fotobiologia.....	19
1.2.1. A pele branca e a pele melanodérmica.....	20
1.2.2. A pele atrófica e a pele elastótica.....	21
Justificativas.....	23
Objetivos.....	24
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
2.1. Amostragem.....	26
2.2. Coleta das biópsias.....	27
2.3. Preparo histológico dos fragmentos.....	27
2.4. Estudos morfológicos.....	29
2.4.1. Epiderme.....	30
2.4.2. Zona da membrana basal.....	30
2.4.2.1. Reação imunoistoquímica.....	31
2.4.3. Derme.....	31
2.5. Análise estatística.....	33

3. RESULTADOS.....	35
3.1. Pacientes.....	36
3.2. Microscopia: aspectos gerais.....	37
3.2.1. Epiderme.....	42
3.2.2. Zona da membrana basal.....	44
3.2.3. Faixa subepidérmica.....	46
3.2.4. Derme.....	47
3.2.5. Resultados estatísticos.....	47
4. DISCUSSÃO.....	51
5. CONCLUSÃO.....	57
6. SUMMARY.....	59
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63
8. ANEXO – TABELAS E FOTOS.....	73

Área derm A:	área da derme de A
Área epi A:	área da epiderme de A
DERME A:	colágeno dérmico de A
E_CORN_A:	espessura camada córnea em A
E_ESPIN_A:	espessura camada espinhosa em A
EL FIBR A:	fibras elastóticas de A
E_TOT_A:	espessura total da epiderme em A (área exposta)
FX SUB A:	faixa subepidérmica de A
GRAN # A:	número de camadas da granulosa em A
Idade:	(anos)
M BAS A:	membrana basal de A
Padrão:	1 = atrofia 2 = elastose
Que mel A:	queratinócitos melanizados em A
Sexo:	1 = masculino 2 = feminino
Tipo de pele:	(fototipos 1 = I, 2 = II, 3 = III)
Tumor:	0 = ausente 1 = presente

	PÁG
Tabela 1: Médias das espessuras da epiderme e respectivos desvios (em milímetros).....	43
Tabela 2: Médias e desvios do número de camadas da granulosa e do número de queratinócitos melanizados.....	44
Tabela 3: Relação entre as áreas de pele total, nas três regiões (em mm ²).....	44
Tabela 4: Medidas da espessura da membrana basal nos diferentes fototipos, conforme padrão clínico (sem conversão para milímetros).....	45
Tabela 5: Médias das variáveis da derme.....	46

	PÁG
Figura 1: Retícula de ciclóides.....	32
Figura 2: Retícula de segmentos de reta.....	33
Figura 3: Fragmento de pele exposta onde se evidencia hiperqueratose em cesta de vime, faixa subepidérmica e degeneração basofílica do colágeno.....	38
Figura 4A: Fragmento de pele exposta, onde se observa elastose difusa e densa.....	39
Figura 4B: Fragmento de pele exposta, onde se observa elastose difusamente frouxa e esparsa.....	39
Figura 5A: Padrão clínico elastótico, fototipo III.....	40
Figura 5B: Padrão clínico atrófico, fototipo I.....	41
Figura 6: Fragmento de área coberta evidenciando membrana basal com reação imunoistoquímica para colágeno IV.....	45

	PÁG
Quadro 1: Medidas quantitativas e respectivas colorações e aumentos utilizados na leitura.....	29
Quadro 2: Distribuição dos pacientes em relação ao sexo, fototipo e aspecto de pele.....	36
Quadro 3: Número de pacientes portadores de tumor nos diferentes fototipos e aspectos cutâneos.....	37



RESUMO

Fotoenvelhecimento e fotodano são temas desafiadores e inesgotáveis. A maioria dos estudos enfatiza os aspectos epidérmicos, enquanto outros os dérmicos. Todavia, há poucos trabalhos referentes à íntima correlação entre estes dois compartimentos, que devem ser considerados como um todo: a unidade dermoepidérmica.

O estudo foi baseado em 61 trabalhadores com mais de dez anos de fotoexposição, acima de 45 anos, que apresentavam dois padrões básicos de fotodano cutâneo: atrofia e elastose, dentro dos mesmos fototipos de pele I, II e III, segundo Fitzpatrick. Biópsias com “punch” de 5mm foram realizadas nas áreas livres de tumor ou de outras lesões na área exposta (1/3 proximal do antebraço), parcialmente exposta (1/3 médio interno do braço) e não-exposta (raiz lateral da coxa). Medidas da área da epiderme e derme foram avaliadas mediante análise de imagem computadorizada, com desenho à mão livre. O estudo estereológico da derme foi feito por meio da retícula de ciclóides (para fibras elásticas) e retícula segmentada (para fibras colágenas). A membrana basal foi estudada por imunoistoquímica. Foram avaliados os seguintes aspectos: espessura e área da epiderme e da derme, quantidade de tecido elastótico, quantidade de fibras colágenas, número de queratinócitos melanizados, número de camadas de células granulosas, espessura e continuidade da membrana basal e avaliação da faixa subepidérmica.

Resultados: Na amostra examinada de indivíduos caucasóides crônica e intensamente expostos ao sol, a análise estatística revelou correlação significativa entre:

- a) **padrão clínico e fototipo:** quanto menor o fototipo, maior a atrofia da pele;
- b) **sexo e queratinócitos melanizados na área exposta:** a pele cronicamente exposta ao sol apresenta pigmentação de distribuição irregular, significativamente mais acentuada nos indivíduos do sexo masculino;
- c) **presença de neoplasias e idade:** a freqüência das neoplasias cutâneas é progressiva com a idade; o efeito deletério solar é cumulativo nos caucasóides de qualquer fototipo e de qualquer padrão clínico de fotodano;

d) **idade e espessura da epiderme:** conforme já está bem documentado, a epiderme cronicamente exposta ao sol é mais espessa que a semi-exposta ou a coberta; porém, foi observada correlação negativa entre a idade e a sua espessura na região cronicamente exposta ao sol. Ou seja, mesmo na área fotodanificada, ocorre atrofia epidérmica progressiva com a idade;

e) **área da epiderme e área da derme:** a área total epidermodérmica da pele do braço mostrou-se menor do que a do antebraço e esta menor do que a da coxa, sendo a medida da epiderme inversamente proporcional à da derme. Ou seja: nos locais em que a derme é mais espessa, a epiderme é mais delgada;

f) **padrão clínico e colágeno na área não exposta:** na pele coberta, o número de fibras colágenas da derme reticular é significativamente menor nos indivíduos de padrão atrófico, relativamente aqueles de padrão elastótico;

g) **idade e área dérmica na porção interna do braço:** quanto maior a idade, menor a área da derme, ou seja, nesta região anatômica, ocorre atrofia progressiva da derme, com o avançar da idade.

Não foi observada correlação entre:

a) **o padrão clínico (atrófico ou elastótico) e:** 1- a idade; 2- o sexo; 3- quaisquer das contagens ou medidas epidérmicas ou dérmicas: uma vez que as diferenças entre os padrões (atrófico ou elastótico), tão aparentes à clínica, não se embasaram nem na espessura ou área da epiderme ou derme e nem no teor de fibras colágenas ou elásticas, pode-se cogitar que haja uma diferença na configuração espacial da pele elastótica, que seria, eventualmente, mais ondulada que a atrófica;

b) **o fototipo (I, II, III) e:** 1- a idade; 2- o sexo; 3- quaisquer das contagens ou medidas epidérmicas ou dérmicas;

c) **presença de neoplasias e fototipo ou padrão clínico:** não houve diferença significativa entre a presença ou a ausência de tumor e: 1- fototipo (I, II, III); 2- padrão clínico (atrófico ou elastótico);

d) **medida da zona da membrana basal e fotoexposição:** não foi encontrada diferença significativa entre a espessura da zona da membrana basal na pele das áreas exposta, semi-exposta e coberta.

Todos os demais achados estão conformes ao que está descrito na literatura.

Conclusão: Na amostra estudada (pele crônica e intensamente exposta ao sol), foi observado que: a) indivíduos caucasóides apresentam propensão crescente a desenvolver neoplasias cutâneas, à medida que o tempo de exposição se prolonga e não há diferença significativa de risco entre os diferentes fototipos (I, II, III) e padrões clínicos (elastótico ou atrófico); b) a pele fotodanificada apresenta modificações de espessura e textura dos seus vários elementos, que não diferem, significativamente, entre os diferentes fototipos e padrões clínicos.



1. INTRODUÇÃO

Desde os primórdios dos tempos, o sol tem sido objeto de adoração, como fonte geradora de inúmeros recursos para a humanidade e o sistema em que se vive. Ele é uma fonte importante de radiação ionizante que, ao lado de seus efeitos benéficos, também é capaz de gerar mutagênese e carcinogênese a longo prazo. Com o passar dos anos, o homem adquiriu maior longevidade e passou a se preocupar também em dar mais 'vida' aos anos. A literatura médica tem mostrado uma preocupação crescente, nos últimos anos, com o processo de envelhecimento como um todo e, particularmente, com o envelhecimento cutâneo (BRANCHET *et al.*,1990; GILCHREST&YAAR,1992; GILCHREST,1996; MONTAGNA, KIRCHNER, CARLISLE,1989; MONTAGNA & CARLISLE,1990; UITTO, FAZIO, OLSEN,1989) e, desde a década de 70, numerosos trabalhos têm sido conduzidos no seu estudo. Esse processo pode ser subdividido em componentes intrínseco, que compreende os fatores biológicos do processo de envelhecimento (GILCHREST,1989; GILCHREST,1996) e componente extrínseco (LAPIÈRE,1990; LAVKER,1979), que agrega os fatores externos, ambientais, que influem na sua aceleração.

1.1. FOTOENVELHECIMENTO VERSUS ENVELHECIMENTO CRONOLÓGICO

As alterações cutâneas observadas no envelhecimento cronológico (ou intrínseco, natural e constitucional) (ADHOUTE *et al.*,1992; BHAWAN *et al.*,1995; BOLOGNIA,1995; CERIMELLE, CELLENO, SERRI,1990; MARKS , MORYKWAS, WHEATLEY,1990; MERA *et al.*,1987; OIKARINEN,1990; SMITH *et al.*,1962; WARREN *et al.*,1991) não são exatamente iguais às do envelhecimento extrínseco (particularmente dependente da ação da luz solar, sendo, portanto, chamado de fotoenvelhecimento ou heliodermatose) (FONSECA & SOUZA,1984; LAPIÈRE,1990; LAVKER,1979).

A despeito dos cuidados diários e escrupulosa observância de todos os fatores que podem interferir na beleza da pele jovem (o sol, o vento, raios infravermelhos e ultravioleta de outras fontes) (MONTAGNA & CARLISLE, 1990), o relógio biológico produz, lenta e inexoravelmente, alterações morfológicas que podem ser identificadas à clínica (LEYDEN,1990; TSUJI *et al.*, 1986) e à histologia (KURBAN & BHAWAN,1990)

(RONGIOLETTI & REBORA, 1995)). Observa-se progressiva laxidão, rugas finas, palidez, xerose e desenvolvimento de tumores benignos, como os papilomas e os hemangiomas senis. A hipoderme sofre atrofia na face e no dorso das mãos, o nariz e a orelha se tornam proeminentes, os cabelos mais finos e menos numerosos, surgindo pêlos terminais nas orelhas e sobrancelhas do homem e no lábio superior e mento das mulheres. Do ponto de vista histológico, a laxidão e as rugas são reflexo da redução de espessura da derme, assim como da sua massa de colágeno, número de fibroblastos e fibras elásticas. A xerose, entre outros, da redução da massa de ácinos sudoríparos e da função das glândulas sebáceas. A palidez, da redução da rede vascular que, associada a outros fatores, repercute numa renovação precária dos queratinócitos e má habilidade de cicatrização. Entre a terceira e sétima décadas de vida há uma diminuição na taxa de renovação celular de aproximadamente 50%. As cãs resultam de uma progressiva e, às vezes total perda de melanócitos nos bulbos pilosos. A redução numérica e funcional das células de Langerhans e de linfócitos T explica, em parte, a tendência maior a infecções (herpes zóster, por exemplo) e desenvolvimento de neoplasias. A membrana basal acha-se delaminada, reduplicada, os cones epiteliais e os processos podais dos queratinócitos retificados, e, ao exame clínico, segue-se a propensão a bolhas e esfolamentos ‘espontâneos’.

A pele cronicamente exposta ao sol experimenta uma aceleração dos efeitos inevitáveis, dependentes da idade (IMAYAMA & BRAVERMAN,1989) (MONTAGNA & CARLISLE, 1990), porém alguns achados são específicos e nunca observados nas áreas cobertas. À clínica (HÖLZLE,1992; LEFFEL *et al.*, 1988) a pele torna-se amarelada, com rugas finas e grossas, superfície irregular, com excrescências, dependentes da elastose (ROGERS & GILCHREST, 1990). Apresenta-se manchada, pela melanização excessiva e irregular dos queratinócitos (LU *et al.*,1996), hiperplasia melanocítica e desenvolvimento de lentigos solares. A superfície é áspera, descamativa, pelo distúrbio na maturação e cornificação dos queratinócitos. Ocorre propensão a púrpuras ao mínimo trauma e a neoplasias malignas envolvendo todos os componentes epidérmicos e dérmicos e neoplasias malignas envolvendo todos os componentes epidérmicos e dérmicos. Do ponto de vista histológico (TSUJI,1988 ; YAMAMOTO *et al.*,1995), as seguintes alterações são observadas, unicamente na pele exposta ao sol: elastose (CHEN *et al*, 1986 ; KLIGMAN *et al*,1986; LOWE *et al.*,1995) e inflamação (KOCHEVAR *et al.* 1994); fenômenos

correlatos, uma vez que a dermatite solar explicaria as alterações das fibras elásticas (FAZIO, OLSEN,UITTO,1989) e desaparecimento das colágenas (SCHWARTZ et al., 1993; TALWAR et al.,1994). A pele solar é hipercelular (FLOTTE et al, 1989), com mononucleares, fibroblastos e mastócitos em maior número, enquanto que a pele cronologicamente envelhecida é hipocelular (PIHLMAN & LINDER, 1983). A elastose se manifesta como o achado mais exuberante e decorre da desestruturação da rede de fibras elásticas (LEDOUX-CORBUSIER & ACHTEN, 1974), desde sua porção mais tênue, subepidérmica (fibras oxitalânicas, que são terminais, dispostas em ‘escova’ e as elaunínicas, pré-terminais, dispostas em ‘arcada’, com aspecto tubular, de onde partem as primeiras) até as fibras elásticas propriamente ditas na derme reticular média (COTTA-PEREIRA, GUERRA, BITTENCOURT-SAMPAIO, 1976), onde podem se formar verdadeiros grumos amorfos e espessos, resultantes de uma produção alterada do fibroblasto (BRAVERMAN & FONFERKO,1982; LANDMAN,1991).

Na epiderme, há alterações que se iniciam com um processo de hiperqueratose e culminam com atipias celulares (GILCHREST,1996; LAPIÈRE,1990; MONTAGNA & CARLISLE,1990).

Os vasos apresentam espessamento da membrana basal. Há aumento da quantidade de glicosamino e proteoglicanas paralelamente à atrofia do colágeno e formação de uma faixa reparativa, por síntese contínua de pró-colágeno tipo I, na região subepidérmica.

1.2. FOTOBIOLOGIA

Estuda a interação dos raios eletromagnéticos (aqueles cuja direção de propagação é perpendicular à de oscilação) , de diferentes comprimentos de onda, sobre os sistemas biológicos (BEITNER,1986) . Parte dos raios não-ionizantes, cuja fonte principal é o sol, é absorvida e só esta pode determinar uma resposta biológica. Qualquer molécula da pele que absorver a luz será chamada de cromóforo (exemplo : DNA e queratina) . Esta molécula sofrerá uma ativação e algum tipo de mudança, quando passará a ser

chamada de fotoproduto. Neste ponto se iniciam processos bioquímicos complexos, como ativação de enzimas, formação de radicais livres e replicação de DNA, fenômenos celulares como proliferação e mutagênese, perda de marcadores de superfície e toxicidade, sendo então observados seus efeitos biológicos como eritema, hiperplasia, displasia e tumores. Os raios ultravioleta A (RUVA) (comprimentos de onda entre 320 e 400 nm) e B (RUVB) (entre 290 e 320 nm), capazes de alcançar a superfície da Terra, irão determinar estas alterações cutâneas, a partir do momento em que são absorvidos (GARMIN *et al.*,1992; HAVENITH *et al.*,1990; LOWE *et al.*,1995; STERN & MOMTAZ, 1984). Os RUVB são aqueles que induzem o eritema, que são bloqueados pelos fotoprotetores e que estão atingindo a superfície da Terra em maior intensidade, com a rarefação da camada de ozônio. Os RUVA, para exercerem efeito mais significativo, devem atuar em doses 1.000 vezes superior às dos RUVB. Contudo, estão presentes na luz solar durante todo o dia, e, no verão, centenas de vezes mais que os RUVB e não são bloqueados, acima da faixa de 350 nm, pelos fotoprotetores disponíveis (BOYD *et al.*, 1995). Além disso, os RUVA potencializam os efeitos dos RUVB (ZHENG & KLIGMAN, 1993) e, na combinação destes, em alguns comprimentos de onda, intensifica-se a ação sobre o colágeno dérmico e acelera-se a tumorigênese. Quando a luz alcança a pele, uma parte é reemitida, a outra é reabsorvida nas várias camadas e, ainda uma fração é reemitida num comprimento de onda maior (fluorescência) (BILLINGHAM & SILVERS,1973; KLIGMAN, 1989; NAKAMURA & JOHNSON,1968; SAMS, SMITH, BURK, 1964; TAYLOR *et al.*, 1990).

1.2.1. A pele branca e a pele melanodérmica

A pele muito branca absorve maior parte dos RUVB, com relação à pele pigmentada e reemite menos, porque a melanina age como um filtro (NÜRNBERGER *et al.*,1978; OLSON, GAYLOR, EVERETT, 1973). A quantidade de melanina presente na pele é determinada de forma genética (constitucional) ou facultativa (capacidade de se bronzear). Quando ela é transferida aos queratinócitos, em parte, apresenta, também, uma queda para a derme, particularmente nos indivíduos melanodérmicos e, à medida que os queratinócitos atingem os estratos mais superficiais da epiderme, ela sofre hidrólise (melanina não particulada ou degradada, pouco evidente), exceto nos indivíduos

melanodérmicos. Estes apresentam muita melanina particulada na superfície. A melanina é capaz de absorver a luz não visível (UV), dispersá-la (mudar a sua trajetória) e os seus radicais livres são estáveis, permitindo trocas. A ação dos RUV sobre outros elementos cutâneos liberaria radicais livres, não estáveis, que interfeririam muito mais sobre o metabolismo celular. Acredita-se, assim, que a ação dos RUV sobre a pele determina o aparecimento de alterações mais expressivas, nos indivíduos de pele clara (SAYRE *et al.*, 1981).

1.2.2. A pele atrófica e a pele elastótica

Há um espectro de variantes clínicas da elastose, que são dependentes do local anatômico, extensão, gravidade da exposição e fatores ambientais (CALDERONE & FENSKE, 1995). A variedade elastótica (*cutis citrina* de Milian), a mais conhecida, apresenta-se, à clínica, como uma pele enrugada, sulcada, inelástica, semelhante a couro, irregularmente pigmentada, com um fundo amarelado. A sua variante atrófica (eritema solar crônico), descrita em indivíduos claros, de origem celta, manifesta-se como uma pele atrófica, exibindo teleangiectasias e hiperplasia de glândulas sebáceas, porém ausência de rugas. Estes indivíduos são particularmente propensos a desenvolver múltiplos tumores agressivos da pele (CALDERONE & FENSKE, 1995 ; FENSKE & LOBER, 1986).

Uma vez que pessoas de pele clara, fototipos I, II ou III podem apresentar predominantemente uma ou a outra destas variantes de elastose e que, apenas a variante atrófica associa-se ao desenvolvimento de neoplasias malignas múltiplas, não é, unicamente o teor de melanina que norteará o efeito dos RUV sobre a pele exposta, mas sim, a resposta global da pele à injúria solar. O conjunto de elementos dermoepidérmicos configura a unidade dermoepidérmica. A epiderme e a derme não são compartimentos anatômicos estanques. (TUAN *et al.*, 1994; SUETAKE *et al.*, 1996) Pelo contrário, tudo o que ocorre na epiderme repercute na derme e vice-versa (SCHELLANDER & MARKS, 1973). Como exemplo, a infecção dérmica pelo *Paracoccidioides brasiliensis* irá determinar a hiperplasia pseudoepiteliomatosa da epiderme. A epiderme que recobre uma área de derme cicatricial desenvolverá, ao longo do tempo, uma neoplasia maligna (exemplo: carcinoma espinocelular em cicatriz de queimadura antiga ou úlcera de Marjolin). (MITRANI, 1978).

Muitos são os trabalhos na área de envelhecimento cutâneo , com vários relatos morfológicos, porém, pouco se tem descrito com relação à unidade dermoepidérmica (FONSECA & SOUZA, 1984).

Os serviços médicos da cidade de Campinas atendem a uma população de pacientes da própria cidade e das regiões vizinhas, onde está representada boa parcela de indivíduos de pele clara, descendente de imigrantes europeus, de baixo nível sócioeconômico e vinculados fundamentalmente à atividade rural. Alguns pacientes apresentam a pele delgada, extremamente apergaminhada e atrófica, enquanto que, outros, intensa elastose, com os elastomas de Dubreuilh.

A quantidade de estudos sobre o envelhecimento em geral e em especial sobre o envelhecimento cutâneo mostra que se trata de assunto fascinante e ainda inesgotado. Muitos estudos enfocam as alterações epidérmicas, outros as alterações dérmicas, sob variados aspectos (fibras colágenas, fibras elásticas, microvasculatura, imunologia, etc.); entretanto, pouco se tem observado da correlação entre estes compartimentos em íntimo contato e que devem ser considerados um todo.

Além disso, dentro dos fototipos considerados caucasóides (I a III) existem diferenças de comportamento cutâneo em relação às mesmas agressões, ou seja, indivíduos com o mesmo fototipo ou semelhante podem apresentar tendência ao pólo da elastose e outros à extrema atrofia e formação de tumores. Qual ou quais seriam os fatores que determinam esses comportamentos variados em indivíduos tão semelhantes? Seria possível, por meio da morfologia e da morfometria qualificar e quantificar essas semelhanças e dissemelhanças? Seria o teor de colágeno e de fibras elásticas variável dentro do mesmo fototipo e como se traduz na resposta epidérmica dessas mesmas alterações? É este o enfoque do estudo proposto e sob este ângulo pouco se tem observado na literatura.

JUSTIFICATIVA DO TRABALHO

Considerando-se que:

A- O câncer de pele, atualmente, vem sendo considerado um problema de Saúde Pública no Brasil e que uma grande parcela da população é descendente de imigrantes europeus, com atividades na lavoura;

B- A pele cronicamente exposta ao sol, de padrão atrófico, é considerada como mais suscetível ao desenvolvimento de múltiplas neoplasias cutâneas, relativamente àquela de padrão elastótico;

C- A pele clara, nos fototipos I e II de Fitzpatrick, é considerada como mais suscetível ao desenvolvimento de múltiplas neoplasias cutâneas, relativamente àquela nos fototipos mais melanodérmicos;

D- A ação de um ou vários fatores sobre a unidade dermoepidérmica associa-se ao desenvolvimento das neoplasias cutâneas;

E- Não há estudos que caracterizem, do ponto de vista morfológico, as alterações encontradas na unidade dermoepidérmica nos dois tipos de padrões clínicos: atrófico ou elastótico,

torna-se relevante indagar:

- 1- Qual a relação entre fototipo e padrão clínico?
- 2- Qual a relação entre padrão clínico e interação dermoepidérmica?
- 3- Qual a relação entre padrão clínico, fotodano e matriz extracelular, colágena e elástica?
- 4- O padrão clínico de fotodano, a idade e sexo dos pacientes, assim como a suscetibilidade a neoplasias.

OBJETIVOS DO ESTUDO

O trabalho visa verificar a relação entre os achados clínicos e seus correspondentes histopatológicos encontrados na unidade dermoepidérmica da pele exposta cronicamente à luz solar, comparando-a com a pele não exposta à mesma, de indivíduos com exposição solar crônica, tentando responder às seguintes questões: existe diferença, na microscopia, entre a espessura total da pele da região exposta e a pele não-exposta e quais seriam os elementos modificadores da unidade dermoepidérmica nessas regiões.



2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. AMOSTRAGEM

Foram avaliados 61 voluntários de ambos os sexos, com idade igual ou superior a 45 anos, pacientes do Ambulatório Geral e Ambulatório de Tumores do Hospital Municipal Dr. Mário Gatti em Campinas, cujas atividades variavam desde lavradores, jardineiros, soldadores, perfuradores de poços de petróleo ou artesianos, pedreiros, lavadeiras, chacareiros, oleiros e por fim, freqüentadores de praia. A idade foi escolhida com base na média etária da demanda dos ambulatórios e por considerar-se esse período como um fator de certeza para uma exposição solar capaz de provocar alterações cutâneas.

Os critérios de seleção foram o fototipo, o aspecto clínico da superfície cutânea e antecedente de exposição solar igual ou superior a dez anos.

O fototipo foi determinado segundo a classificação de Fitzpatrick (PATHAK *et al.*, 1999) em I, II e III, a partir da avaliação clínica do examinador, uma vez que dados obtidos do interrogatório com pacientes não são muito confiáveis (FITZPATRICK, 1988; RAMPEN *et al.*, 1988). Considera-se fototipo I o indivíduo de pele que sempre queima ao expor-se ao sol, que nunca bronzeia. Tem predomínio de cabelos ruivos e olhos azuis. O fototipo II é o indivíduo de cabelos loiros e olhos verdes, de pele que quase sempre queima e raramente bronzeia. O fototipo III tem cabelos e olhos castanhos, sua pele queima com freqüência, porém também bronzeia.

O aspecto clínico da superfície cutânea foi caracterizado por predomínio de elastose ou por atrofia.

O período de exposição solar 'igual ou maior que dez anos' foi uma escolha do examinador.

A presença ou ausência de tumor foi uma observação registrada.

Todos os pacientes avaliados consentiram em participar do estudo, tendo sido previamente informados dos objetivos do trabalho e dos procedimentos a que seriam submetidos.

2.2. COLETA DAS BIÓPSIAS

Biópsias de pele são (superfície cutânea livre e distante de lesões perceptíveis num raio mínimo de 5 cm) foram colhidas sob anestesia local com lidocaína 2% sem vasoconstritor, utilizando-se "punch" descartável de 5mm de diâmetro, marca Stiefel. Foram selecionadas três áreas de coleta determinadas de acordo com a exposição solar e livres de lesões. O terço proximal da face ântero-lateral do antebraço (direito ou esquerdo, conforme a área mais livre de lesões) foi definido com pele exposta (Lâmina A). O terço médio da face ântero-medial do braço (direito ou esquerdo) foi definido como pele parcialmente exposta (Lâmina B), em função das vestimentas de mangas curtas usadas com grande frequência em um país tropical. Embora o quadril seja o local de referência de pele não exposta mais comumente citado na literatura, foi escolhido o terço proximal da região lateral da coxa (direita ou esquerda) como a área não exposta (Lâmina C), por apresentar grande semelhança clínica com a pele do quadril e permitir maior facilidade de realização da biópsia.

2.3. PREPARO HISTOLÓGICO DOS FRAGMENTOS

Os fragmentos de pele foram imersos imediatamente na solução fixadora constituída de formol, ácido acético e mercúrio ('FMA') durante duas horas e, a seguir, transferidos para álcool a 70°GL para posterior inclusão em parafina.

A solução 'FMA' foi utilizada como fixador inicial, em virtude de conservar muito bem as características do colágeno e por conferir maior nitidez às colorações especiais, conforme observado no estudo de TIZIANI (1995). Por se tratar de solução com componente mercurial, o descarte desse material ocorreu de acordo com as normas de segurança e proteção ambiental.

A solução de 'FMA' consiste nos seguintes componentes:

Formol.....	100ml
Ácido acético.....	30ml
Cloreto de mercúrio.....	20g
Água destilada.....	qsp....1000ml

A seguir, procedeu-se a inclusão em parafina e microtomia com cortes de 5µm. Para as análises, foram selecionados os cortes mais bem dispostos na lâmina, tomando-se o cuidado de evitar cortes oblíquos.

As colorações utilizadas foram a hematoxilina e eosina, ácido periódico, reagente de Schiff (PAS, sem diastase), Weigert Verhoeff, Sirius Red, conforme padronização histotécnica (PROPHET *et al*, 1995), além da reação imunoistoquímica com anticorpo para colágeno IV.

Hematoxilina e eosina - coloração utilizada na inspeção inicial e nas medidas de espessura das camadas. As medidas foram feitas com auxílio da régua escalonada, com posterior conversão para milímetros. A régua era posicionada perpendicularmente ao fragmento, num aumento de 400 vezes.

PAS (Ácido periódico, reagente de Schiff) - esta coloração foi utilizada para verificar o aspecto geral da zona de membrana basal, para a contagem dos queratinócitos basais e suprabasais que continham melanina. Foram avaliadas lâminas sem digestão pela diastase.

Weigert Verhoeff - coloração utilizada na avaliação da zona subepidérmica e na avaliação e contagem das fibras elásticas propriamente ditas, presentes na derme reticular superficial.

Sirius Red (ou Picrosirius) - { (Direct Red 80, SIGMA) [2610-10-8], 36554-8, FW 1373.09, Dye 30% } coloração utilizada na visualização e avaliação das fibras colágenas, sob luz polarizada. (DAYAN *et al.*, 1989; JUNQUEIRA, BIGNOLAS, BRENTANI, 1979; JUNQUEIRA, MONTES, SANCHEZ, 1982)

As medidas realizadas, com as respectivas colorações e aumentos fazem parte do Quadro 1.

Quadro 1: Medidas quantitativas e respectivas colorações e aumentos utilizados nas leituras

MEDIDAS (padrão)	OBJETIVA	COLORAÇÃO
Espessura camada córnea (mm) Número de camadas da granulosa (#) Espessura camada espinhosa (mm) Espessura total da epiderme (mm)	40 X	Hematoxilina e eosina
Queratinócitos melanizados (#) Faixa subepidérmica (mm)	40 X	PAS sem diastase
Fibras colágenas (#)	40 X	Sirius Red
Fibras elastóticas (#)	40 X	Weigert Verhoeff
Membrana basal (*)	100 X	Imunohistoquímica (col IV)
Área epiderme (mm ²) Área derme (mm ²)	12,5 X	KS 300 (HE)

Nota: O símbolo # substitui a palavra 'número'.

(*) Sem conversão para milímetros

2.4. ESTUDOS MORFOLÓGICOS

Os cortes de pele foram inicialmente examinados quanto ao aspecto geral, seguido de medidas quantitativas, que foram realizadas por um único e mesmo observador, exceto as medidas estereológicas da derme (Sirius Red), realizadas por dois observadores. Os microscópios ópticos utilizados foram Nikon Alphaphot 2 YS2 e Axioplan2 - Carl Zeiss.

A epiderme, a zona da membrana basal e a derme foram avaliadas quanto ao aspecto geral e por meio de parâmetros morfométricos.

A ocular de régua milimetrada KPL W10x/18 - Carl Zeiss (com aferição) foi utilizada nas medidas de espessuras e comprimento do fragmento.

As áreas da epiderme e da derme foram determinadas em um segmento com 2 mm de comprimento, na região central do corte.

2.4.1. Epiderme

Na epiderme foram medidas a espessura e área totais; a espessura da camada córnea e da camada espinhosa. Foram contados o número de camadas de células da granulosa e o número de queratinócitos melanizados.

As medidas de espessuras e a contagem do número de camadas da granulosa foram feitas em cinco campos oculares equidistantes no fragmento.

Epiderme total - a área foi medida pelo programa KS 300 V2.00, com desenho à mão-livre.

Camada córnea - a medida foi feita desde a porção mais superficial da camada córnea até a primeira camada de células granulosas.

Camada granulosa - foi feita a contagem do número de camadas de células que contêm os grânulos de queratohialina.

Camada espinhosa - foi feita a medida desde a camada inferior de células granulosas, até o limite inferior das células basais da epiderme.

Queratinócitos melanizados - foram contados todos os queratinócitos basais e suprabasais que continham grânulos de melanina em pelo menos 50% de seu citoplasma.

2.4.2. Zona da membrana basal

A presença e o aspecto geral da membrana basal foram observados através da coloração de PAS. A reação de imunoperoxidase com anticorpo anti-colágeno IV foi utilizada para avaliar a integridade da membrana basal, para a medida da espessura, além de corroborar na observação feita ao PAS.

2.4.2.1. Reação imunoistoquímica- (colágeno IV, Dako, M 785 - anticorpo monoclonal). O método utilizado foi da estreptavidina-biotina peroxidase. (Descrição da reação no Apêndice). Foi feita avaliação somente nos fragmentos da pele exposta (A) e não-exposta (C). Toda as etapas da reação, desde o preparo da silanização das lâminas até a leitura final e medida da espessura da membrana basal, foram realizadas pelo autor (FOELLMER, MADRI, FURTHMAYR, 1983; GUSTERSON *et al.*, 1984; GUSTERSON, CLINTON, GOUGH, 1986; HAVENITH *et al.*, 1987).

2.4.3. Derme

Na derme foi medida a área e foram contadas as fibras elastóticas e fibras colágenas.

Fibras elastóticas - para a contagem das fibras por meio de estereologia (GUNDERSEN *et al.*, 1988; PUTCHLER, MELOAN, WALDROP, 1988), foi utilizada retícula de ciclóides (Fig.1). Não foi encontrado, até onde se pôde pesquisar na literatura, qual é a orientação tridimensional das fibras elásticas da derme, com o evoluir da idade, nos locais estudados (antebraço, braço e coxa). É possível que elas se distribuam, preferencialmente, de forma paralela à epiderme (configuração horizontal) e o emprego da retícula dos ciclóides, para a contagem, permitiria eliminar os erros inerentes a essa configuração espacial predominante. Foram contadas apenas as fibras elastóticas individualizáveis, pois havia grumos amorfos na derme superficial. A retícula era posicionada abaixo da região subepidérmica e dez campos oculares foram avaliados e contadas quantas vezes as fibras elastóticas cruzavam os 37 ciclóides da retícula, independentemente de quantas vezes uma mesma fibra elástica cruzasse um mesmo ciclóide. O total foi dividido pelo número de campos avaliados (10 campos).

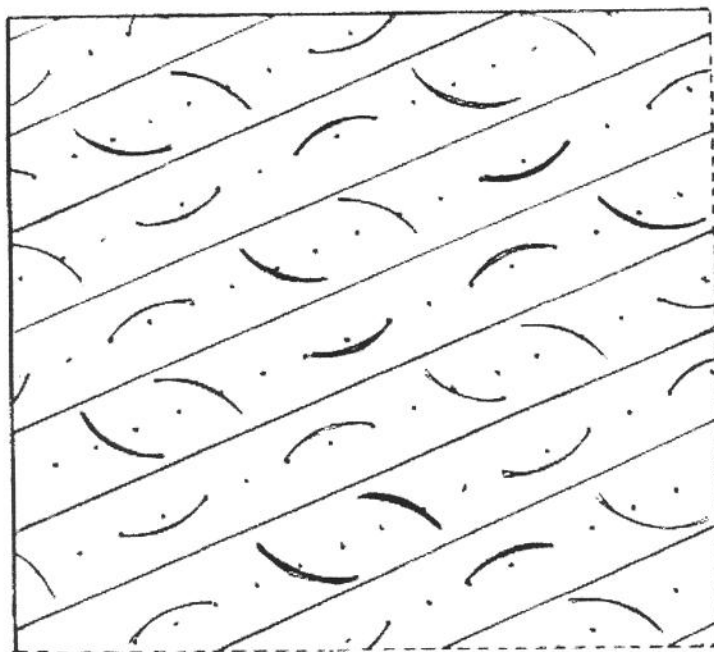


Figura 1: Retícula de ciclóides

Fibras colágenas - Foi utilizada retícula de traves paralelas com segmentos de reta (Fig. 2). A contagem de fibras, através desta retícula, é mais simples e mais rápida em relação a dos ciclóides e se sabe que a distribuição tridimensional das fibras colágenas da derme se faz numa trama enovelada (enrodilhada 'matlike') (MORAGAS *et al.*, 1998). Foi observado que uma mesma banda colágena mudava de cor, à luz polarizada, quando se girava a platina do microscópio. Desta forma, a retícula foi posicionada na zona subepidérmica e foi feita a contagem de todas as fibras verdes à luz polarizada (escolha aleatória do observador). Eram contabilizadas as fibras que cruzavam um segmento de reta, em dez campos oculares.

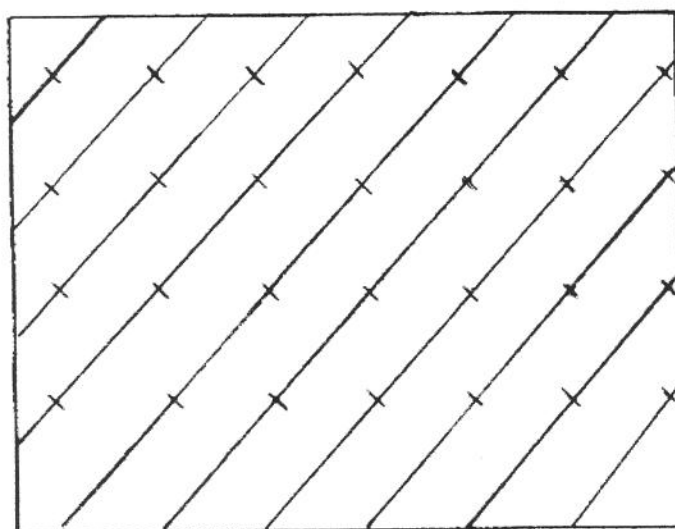


Figura 2: Reticula de segmentos de reta

2.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram apresentados como média e desvio-padrão, além de processos matemáticos de soma das áreas e razão das mesmas.

As variáveis quantitativas foram comparadas, entre grupos independentes, pelo Teste Kruskal-Wallis para mais de dois grupos, complementado pelo Teste de Mann-Whitney.

Quando a comparação envolvia dados correlacionados, utilizou-se, correspondentemente, o Teste de Friedman, complementado pelo Teste de Wilcoxon.

Quando houve o concurso de mais de um fator, utilizou-se a Análise da Variância, segundo o modelo fatorial, após ajuste da variável dependente pelas médias de outras variáveis, que eventualmente estivessem com elas correlacionadas.

A associação entre variáveis qualitativas foi estudada pelo Teste do Qui-quadrado, aplicado a Tabelas de Contingência.

Com o mesmo propósito, optou-se pela Análise de Correlação Simples (Coeficiente de Correlação de Pearson), entre variáveis quantitativas ou quantitativas e qualitativas.

Essa análise também precedeu a Análise de Regressão Múltipla, cujo objetivo foi verificar a importância de cada variável independente sobre a dependente.

Em todos os casos adotou-se o nível de 0,05 para declaração de ocorrência de significância estatística ($p < 0,05$)



3. RESULTADOS

3.1. PACIENTES

Foram estudados 19 homens e 42 mulheres, sendo 18 pacientes do fototipo I (29,5%); 28 do fototipo II, (45,9%) e 15 do fototipo III (24,6%). Dentre os classificados como fototipo I, seis apresentavam o aspecto clínico da superfície cutânea predominante de elastose e 12 o de atrofia; dos pacientes com fototipo II, 15 tinham elastose e 13, atrofia; dos pacientes com fototipo III, 12 tinham o aspecto de elastose e três, de atrofia. O Quadro 2 apresenta os resultados de acordo com o sexo, fototipo e aspecto clínico da pele. A Fig. 5A ilustra os aspecto clínico predominante de elastose e a Fig. 5B mostra um exemplo de pele com predomínio de atrofia.

Quadro 2: Distribuição dos pacientes em relação ao sexo, fototipo e aspecto da pele

Sexo	Fototipo I		Fototipo II		Fototipo III	
	Elastose	Atrofia	Elastose	Atrofia	Elastose	Atrofia
masculino	02	03	04	03	05	02
feminino	04	09	11	10	07	01

Foi observada a presença de tumor cutâneo em 34 dos pacientes avaliados (55,7%). Os tumores encontrados compreendiam carcinomas basocelulares e espinocelulares. Não houve diferenças estatisticamente significativas em relação ao sexo, mas foi observada uma associação com a idade dos pacientes, sendo maior a frequência de tumores em pacientes mais idosos ($p=0,03$).

Dos 34 pacientes com tumor, 10 eram do fototipo I (29,4%), 16 do fototipo II (47,0%) e oito do fototipo III (23,5%). Em relação ao aspecto clínico, 16 (47,1%) apresentavam predomínio de elastose e 18 (52,9%) apresentavam pele atrófica. Não houve diferenças estatisticamente significativas da presença de tumor em relação ao fototipo ($p=0,31$) nem ao aspecto clínico ($p=0,07$).

O Quadro 3 mostra a distribuição dos pacientes com tumor nos diferentes fototipos e quanto ao predomínio clínico.

Quadro 3: Número de pacientes portadores de tumor nos diferentes fototipos e aspectos cutâneos

Tumor	Fototipo I		Fototipo II		Fototipo III		Total
	Elastose	Atrofia	Elastose	Atrofia	Elastose	Atrofia	
Presença	03	07	07	09	06	02	34
Ausência	03	05	08	04	06	01	27
Total	06	12	15	13	12	03	61

3.2. MICROSCOPIA: ASPECTOS GERAIS

Numa avaliação geral do aspecto microscópico dos fragmentos de pele das três áreas foi observado que as lâminas da área exposta (A) apresentavam aspectos caracteristicamente distintos em relação às outras duas áreas (B e C). Em todos os cortes da pele exposta havia hiperqueratose ortoqueratótica em cesta de vime, presença da camada fibrosa subepidérmica e degeneração basofílica do colágeno (Fig. 3). Essas lâminas eram tão características, que se tornava possível reconhecer com exatidão de que área se tratava o material examinado, sem necessidade da identificação da lâmina.



Figura 3: Fragmento de pele exposta onde se evidencia hiperqueratose em cesta de vime (H), faixa subepidérmica (SE) e degeneração basofílica do colágeno (DB)

Outra observação foi o fato de que as lâminas da área exposta (A) apresentavam elastose ora de padrão difuso, acometendo mais da metade superior da derme reticular, ora de um padrão mais frouxo, com fibras mais esparsas, como mostram as Figs. 4 A e 4B.

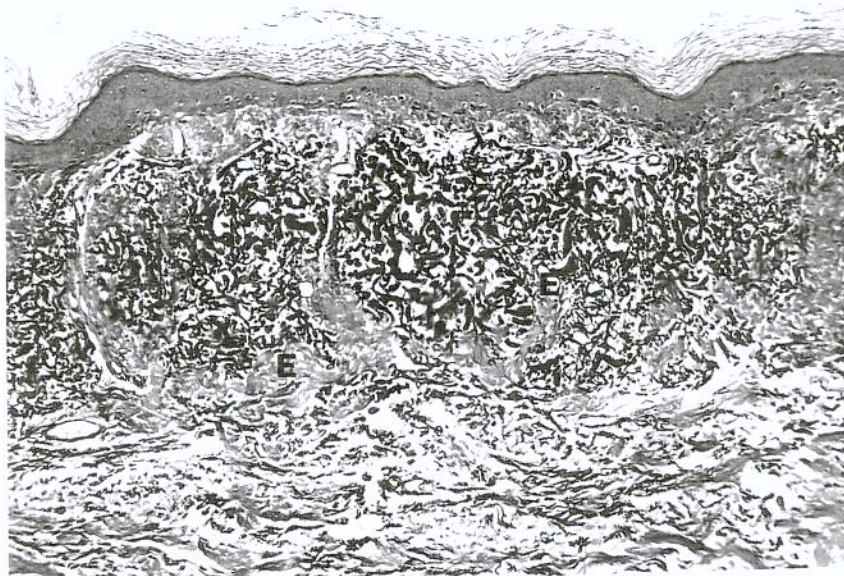


Figura 4 A: Fragmento de pele exposta, onde se observa elastose difusa e densa (E)

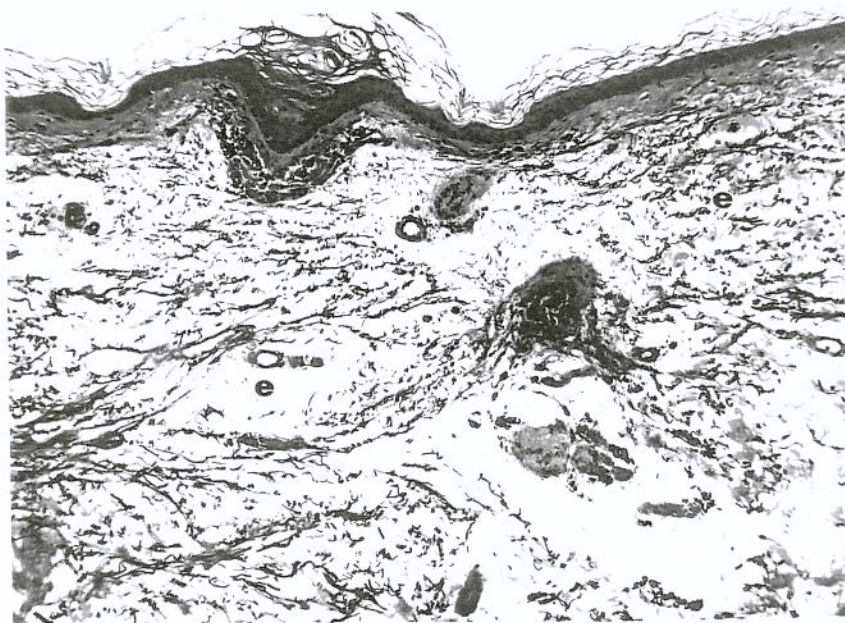


Figura 4B: Fragmento de pele exposta, onde se observa elastose difusamente frouxa e esparsa (e)



Figura 5A: Padrão clínico elastótico

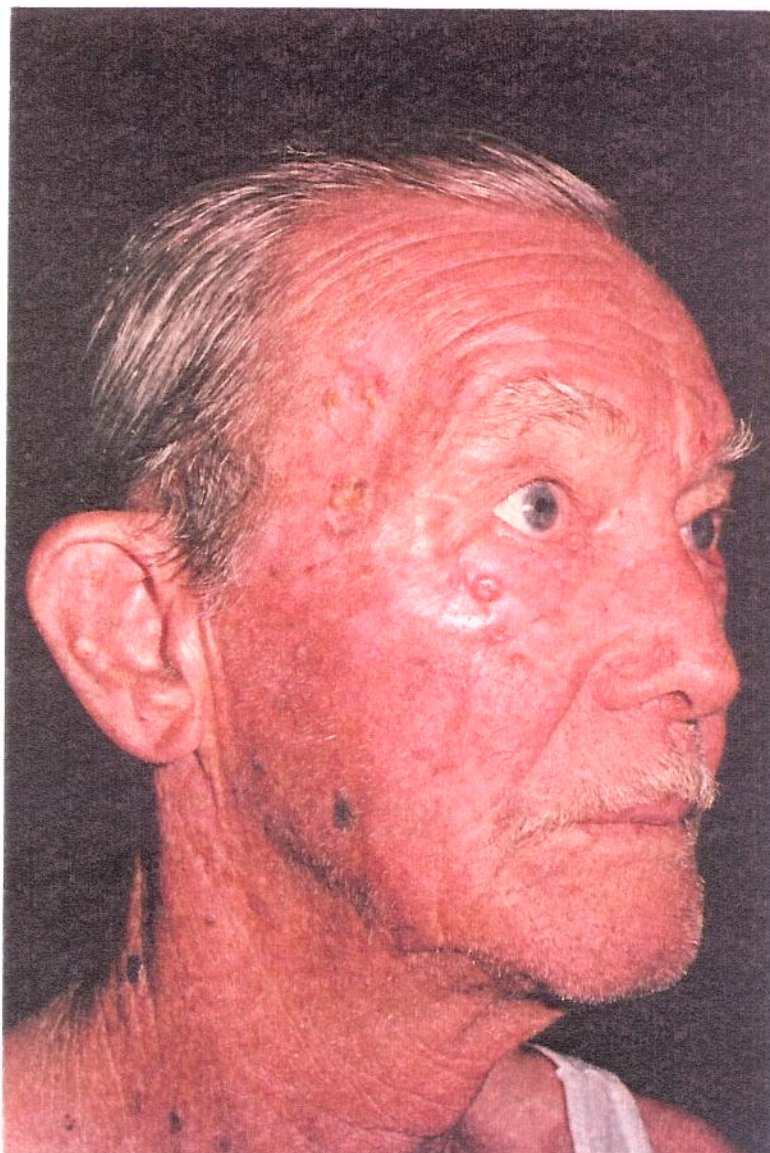


Figura 5B: Padrão clínico atrófico

3.2.1. Epiderme

Em relação às medidas realizadas na epiderme (área, espessuras e número de camadas da granulosa e de queratinócitos melanizados), não foram encontradas associações com o fototipo nem com o diagnóstico do padrão de pele (exceto na medida de espessura da camada espinhosa da pele parcialmente exposta em relação ao fototipo).

A respeito da espessura total da epiderme, também não houve diferenças quanto ao sexo ou à idade dos pacientes.

A pele exposta, entretanto, possui a epiderme mais espessa, e não houve diferenças significativas entre a pele coberta e a parcialmente exposta.

Da mesma forma que a espessura, também a área total da epiderme não apresentou diferenças quando considerado o sexo. Entretanto, observou-se uma correlação negativa entre idade e área total da epiderme na região fotoexposta, ou seja, quanto mais idoso o paciente, menor a área da epiderme.

Também foram encontradas diferenças entre as três regiões de coleta. A pele mais exposta apresentou valores de espessura maiores do que na região coberta, cujos valores foram maiores do que na pele parcialmente exposta.

A espessura da camada córnea foi maior na área exposta do que nas duas outras áreas que, por sua vez, não foram estatisticamente diferentes entre si.

Quanto à idade e ao sexo, não foram observadas diferenças significativas na córnea.

O número de camadas de células da granulosa foi maior no fragmento A, sendo que em B e em C os valores não diferiram significativamente. Não houve alterações considerando-se o sexo, mas na área parcialmente exposta observou-se diminuição do número das camadas celulares com o avançar da idade.

O aspecto geral da camada espinhosa mostrou maior desorganização celular e mais atipias na área exposta que, junto com a região coberta, apresenta os maiores valores de espessura, não diferindo entre si. A pele parcialmente exposta tem a espinhosa significativamente menor.

Em relação ao sexo e à idade, não foram observadas diferenças, exceto na pele coberta, onde houve correlação com a idade (quanto mais idoso o paciente, menor a espessura da camada espinhosa). Quanto ao fototipo, a pele parcialmente exposta apresentou uma associação positiva: quanto mais clara a pele, mais fina a camada espinhosa.

A área da epiderme, por sua vez, mostrou valores maiores na pele exposta, seguida da pele coberta e, por fim, tendo menor valor na pele parcialmente exposta. Houve associação positiva da área da epiderme com a espessura da camada espinhosa, ou seja, quanto maior a camada espinhosa, maior a área da epiderme. Não houve associação com sexo, padrão clínico, idade ou fototipo.

A contagem de queratinócitos melanizados, embora não tenha demonstrado relação com a idade, indicou uma associação com o sexo do paciente, havendo maior número nos homens.

A pele fotoexposta apresentou maior quantidade de células, seguida da pele parcialmente exposta e, por último, da pele coberta.

Os valores médios das espessuras das diversas camadas da epiderme estão apresentados na Tab. 1. As medidas de área constam da Tab. 3.

Tabela 1: Médias das espessuras da epiderme e respectivos desvios (em milímetros)

Medidas	Média e desvio-padrão
Espessura total epiderme A	0,113 ± 0,022
Espessura total epiderme B	0,088 ± 0,017
Espessura total epiderme C	0,098 ± 0,015
Espessura córnea A	0,060 ± 0,023
Espessura córnea B	0,042 ± 0,013
Espessura córnea C	0,046 ± 0,014
Espessura espinhosa A	0,043 ± 0,010
Espessura espinhosa B	0,038 ± 0,009
Espessura espinhosa C	0,043 ± 0,009

Os resultados das contagens celulares e do número de camadas da granulosa fazem parte da Tab. 2.

Tabela 2: Médias e desvios do número de camadas da granulosa e do número de queratinócitos melanizados

Medidas	Média e desvio-padrão
Número camadas granulosa A	$2,097 \pm 0,420$
Número camadas granulosa B	$1,559 \pm 0,376$
Número camadas granulosa C	$0,345 \pm 0,345$
Queratinócitos melanizados A	$14,305 \pm 6,649$
Queratinócitos melanizados B	$4,941 \pm 5,490$
Queratinócitos melanizados C	$2,809 \pm 3,742$

Tabela 3: Relação entre as áreas de pele total, nas três regiões (em mm²)

Área	Exposta	Parcialmente exp.	Coberta
Epiderme	$0,127 \pm 0,030$	$0,105 \pm 0,024$	$0,117 \pm 0,026$
Derme	$3,785 \pm 1,050$	$3,320 \pm 1,064$	$4,670 \pm 1,370$
Total= E + D	$3,914 \pm 1,053$	$3,425 \pm 1,069$	$4,786 \pm 1,363$
Razão= E ÷ D	$0,037 \pm 0,014$	$0,033 \pm 0,012$	$0,028 \pm 0,014$

3.2.2. Zona da membrana basal

O PAS, corroborado pela reação imunoistoquímica para colágeno IV, mostrou continuidade e integridade da membrana basal (Fig.6). A medida da espessura, tanto na pele exposta quanto na coberta, mostrou valores semelhantes. Entretanto, foi um ponto de dificuldade a avaliação desta área, pois em alguns cortes a membrana basal não se corava, embora todo o rigor na preparação houvesse sido observado. Os valores das medidas da membrana basal se encontram na Tab. 4.

Tabela 4: Medidas da espessura da membrana basal nos diferentes fototipos, conforme padrão clínico (sem conversão para milímetros)

Membrana Basal	Fototipo I	Fototipo II	Fototipo III
Elastose			
Área exposta	$0,115 \pm 0,024$ (n=4)	$0,155 \pm 0,052$ (n=13)	$0,144 \pm 0,042$ (n=10)
Área coberta	$0,142 \pm 0,063$ (n=5)	$0,132 \pm 0,035$ (n=10)	$0,155 \pm 0,040$ (n=10)
Atrofia			
Área exposta	$0,128 \pm 0,042$ (n=9)	$0,143 \pm 0,034$ (n=10)	$0,12$ (n=1)
Área coberta	$0,138 \pm 0,043$ (n=8)	$0,122 \pm 0,022$ (n=6)	$0,140 \pm 0,057$ (n=2)

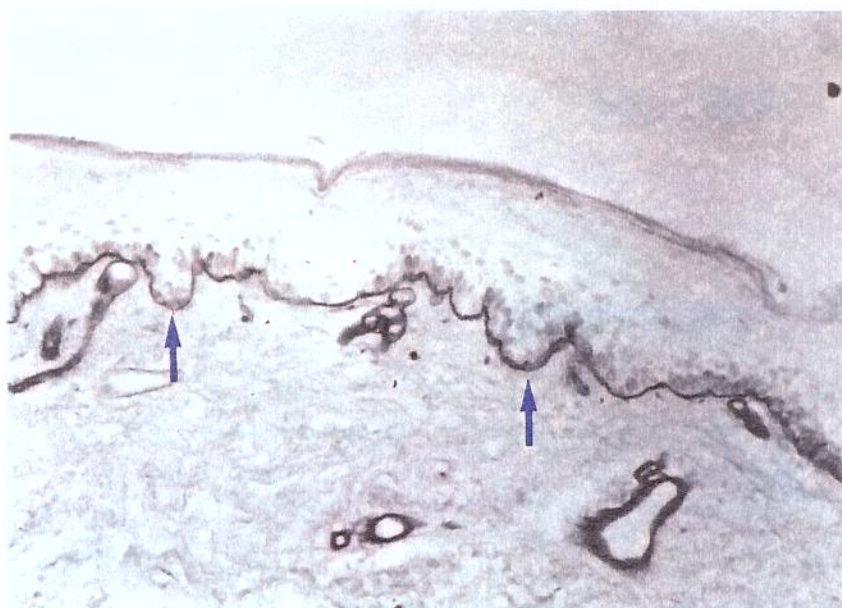


Figura 6: Fragmento de área coberta evidenciando membrana basal com reação imunoistoquímica para colágeno IV (setas)

3.2.3. Faixa subepidérmica

A presença de uma faixa de tonalidade mais acidófila, situada imediatamente abaixo da zona da membrana basal até a porção superior das massas elásticas, foi um achado muito freqüente na pele exposta, tendo sido identificada em 60 fragmentos dos 61 (98%) analisados. Já nas áreas mais fotoprotegidas, foi visualizada em 23 de 60 fragmentos analisados na pele parcialmente exposta (38%) e em 10 de 60 analisados na pele não-exposta (17%).

A medida da faixa subepidérmica na região exposta foi dez vezes maior que na região parcialmente exposta e esta, por sua vez, quatro vezes maior que na região coberta. Os valores das medidas se encontram na Tab. 5.

Tabela 5: Médias das variáveis da derme

Medidas	Média e desvio-padrão
Faixa subepidérmica A	0,014 ± 0,008
Faixa subepidérmica B	0,004 ± 0,010
Faixa subepidérmica C	0,001 ± 0,003
Colágeno A	0,449 ± 0,220
Colágeno B	0,549 ± 0,167
Colágeno C	1,013 ± 0,999
Elastose fibras A	5,376 ± 2,703
Elastose fibras B	2,047 ± 1,574
Elastose fibras C	0,961 ± 1,108

* medidas da faixa subepidérmica em milímetros

** medidas do colágeno e fibras elásticas em números absolutos

3.2.4 Derme

Na derme, as áreas são significativamente diferentes entre si, sendo a maior a área da região coberta, seguida da região exposta e, por último, a região parcialmente exposta. Não houve associação com sexo, fototipo ou padrão. Há uma relação negativa entre a derme da área parcialmente exposta e a idade, ou seja: quanto maior a idade do paciente, menor a área da derme. As medidas das áreas se encontram na Tab. 3.

Havia maior quantidade de fibras elastóticas na área exposta dos três fototipos, seguido pela área parcialmente exposta e não-exposta. Isto foi observado nos dois padrões clínicos de pele. Não houve associação com sexo, fototipo ou padrão.

As fibras colágenas estavam em maior quantidade na área coberta, seguida pela parcialmente exposta e exposta. Havia tendência a menor teor colagênico na área exposta de predomínio elastótico do que no padrão atrófico, dos fototipos I e III. Isto se inverte no fototipo II.

Na avaliação das fibras elastóticas e colágenas, fato observado foi que, quanto maior o teor de fibras elastóticas, menor o teor de fibras colágenas e vice-versa. Em ambas, foi feita análise estereológica e os resultados encontram-se na Tab. 5.

3.2.5 Resultados estatísticos

De acordo com os resultados obtidos da análise estatística, pode-se estabelecer o que se segue:

Gerais: Quanto menor o fototipo, mais atrófica a pele, ou, quanto maior a elastose, maior o fototipo. Não há relação entre fototipo e sexo, idade ou presença de tumor.

Não há relação entre padrão clínico de pele e sexo, ou tumor e sexo, ou idade e padrão de pele.

Espessura camada córnea: A (exposta) > B (parcialmente exposta)

A > C (não - exposta)

B = C

Número de camadas granulosa: A > B , A > C , B = C, houve significância da idade na lâmina B, negativa, ou seja, quanto mais velho, menor a camada granulosa.

Espessura camada espinhosa: A > B , A = C , B < C foi significativa em relação à idade, com o fototipo II.

Queratinócitos melanizados: A > B > C ; em A e B, o número tem associação com o sexo, sendo maior nos homens. Independem de qualquer outra variável das utilizadas.

Faixa subepidérmica : não houve associação entre elas ou com sexo, idade, fototipo, ou padrão: A > B ($p < 0,0001$), A > C ($p < 0,0001$), B > C ($p = 0,003$).

Colágeno dérmico : A < B < C . Na lâmina C houve significância para o padrão clínico de pele ($p = 0,028$): A < C ($p < 0,0001$), A < B ($p = 0,0001$), B < C ($p < 0,0001$).

Fibras elastóticas : sem relação com sexo, fototipo ou padrão. Há diferenças entre os locais, todos com $p < 0,0001$.

Área da derme : há uma relação negativa entre a derme do local B e a idade, com $p = 0,035$, associação fraca (6%). Não houve associação com sexo, fototipo ou padrão e, entre elas, todas são diferentes: A > B ($p = 0,015$), C > A ($p < 0,0001$), C > B ($p < 0,0001$).

Houve correlação negativa, fraca, entre a área da derme e da epiderme na lâmina C, sendo que a área maior da derme corresponde à área menor da epiderme.

Correlações globais: A área da epiderme em A tem correlação positiva com as outras áreas (B e C), por exemplo: quanto maior a área de A, maior será a de B e de C, porém, não há correlação com a área da derme, no mesmo paciente.

As observações acima se encontram sintetizadas nos diagramas a seguir:

Área exposta

Epiderme			
Córnea	A>B	A>C	B=C
Granulosa	A>B	A>C	B=C
Espinhosa	A>B	A=C	B<C
Querat. melanizados	A>B>C	Assoc. ao sexo masc.	
Faixa subepidérmica	A>B (p< 0,0001)	A>C (p< 0,0001)	B>C (p< 0,0003)
Derme	Fibras elastóticas	A>B>C	P< 0,0001

Área coberta

Área da derme	C>A (p< 0,0001)	C>B (p< 0,0001)	B>A (p = 0,0015)
Colágeno da derme	C>A (p< 0,0001)	C>B (p = 0,0001)	B>A (p< 0,0001)
Significante para padrão clínico de pele (p = 0,028)			

Conforme observado na Tab. 3, tem-se as seguintes posições:

- Área total C > Área total A > Área total B
- Área epiderme A > Área epiderme C > Área epiderme B
- Área derme C > Área derme A > Área derme B
- Razão área A > Razão área B > Razão área C

Portanto, as regiões anatômicas selecionadas para biópsia apresentam diferença significativa na espessura da sua derme, que é maior na coxa e menor no braço, observando-se relação inversa com a espessura da epiderme.

Na Análise de Variância, a razão das áreas (epiderme/derme) foi significativa com o padrão de pele na região exposta, ou seja: há uma tendência a predomínio de elastose quando aumenta a epiderme em relação à derme, ou quando diminui a derme em relação à epiderme. Do mesmo modo, haveria uma tendência a predomínio de atrofia quando diminui o numerador (epiderme) ou quando aumenta o denominador (derme).

Na regressão múltipla, os resultados encontrados podem ser visualizados nos quadros abaixo:

1) Variável dependente - **área da epiderme** (região exposta)

Variável independente	Coefficiente de determinação	Incremento do coef. det.
Espessura espinhosa +	30,1%	-
Fibras colágenas +	40,3%	10,2%
Fibras elastóticas -	45,1%	4,8%

2) Região parcialmente exposta - dependeu somente da espessura da espinhosa + (13,2%)

3) Variável dependente: **área da epiderme** (região não-exposta)

Variável independente	Coefficiente de determinação	Incremento coefic. det.
Espessura espinhosa +	28,6%	-
Área da derme -	34,5%	5,9%

4) Variável dependente: **razão das áreas** (epiderme ÷ derme) região exposta

Variável independente	Coefficiente de determinação	Incremento coef. det.
Espessura espinhosa	13,9% +	-
Padrão clínico	23,2% +	9,3%

5) Região não-exposta : só dependeu das fibras colágenas + (27,8%)



4. DISCUSSÃO

Embora a literatura refira um maior risco de câncer de pele entre os indivíduos com a variante atrófica (LOBER & FENSKE, 1990), inclusive citando que esses indivíduos são particularmente propensos a desenvolver múltiplas neoplasias agressivas cutâneas, nesta amostra estudada esta relação não foi observada. Embora pouco numerosa, foi cuidadosamente selecionada com base no exame dermatológico e pode ser ampliada no futuro, analisando-se o padrão de resposta ao sol (atrófico versus elastótico), número de tumores, tipo e localização, pois clinicamente foi observada essa tendência no Ambulatório onde foram avaliados os pacientes, daí o estudo em questão.

MONTAGNA & CARLISLE (1991) mostraram que a epiderme na pele negra raramente evolui para atrofia. No material em análise foi observado que quanto menor o fototipo, mais atrófica é a pele. Essa relação também é corroborada pelo estudo de CALDERONE & FENSKE (1995), que descreveram uma variante atrófica da *cútitis citrina* nas pessoas de pele clara de origem céltica, que exibem intensa atrofia epidérmica, onde se vêem facilmente teleangiectasias e glândulas sebáceas.

Em se tratando de padrão clínico e idade, a não-associação dos dois mostra que o tipo de resposta cutânea (padrão atrófico ou elastótico) à exposição solar é intrínseca à pessoa e não uma função da idade, como, por exemplo, indivíduos mais velhos com pele atrófica e mais novos com pele elastótica.

Entretanto, observou-se uma correlação negativa entre idade e área total da epiderme na região fotoexposta, ou seja, quanto mais idoso o paciente, menor a área da epiderme.

No que se refere ao fototipo, fotodano e suscetibilidade ao câncer, LU, *et al* (1996) encontraram diferentes índices de conteúdo melânico tanto na área exposta, quanto na área coberta entre os diferentes fototipos. FITZPATRICK (1986) comparou a melanina capturada pelos queratinócitos a um filtro, como resultado da exposição crônica ao sol. CALANCHINI-POSTIZZI & FRENK (1987) estudaram o dano actínico crônico na pele pobre e ausente de melanócitos, concluindo que não houve evidência de aumento de dano cutâneo nesses casos. Também descrevem as raras citações de câncer cutâneo nos indivíduos com vitiligo.

VITTELLARO-ZUCCARELLO, *et al* (1994), observaram maior volume fracional de colágeno entre mulheres do que entre homens, antes da quarta década de vida e um gradual aumento com a idade em ambos os sexos até a terceira década de vida, com declínio na densidade das fibras colágenas após a quarta década de vida, especialmente nas coxas (que foi local da biópsia de área coberta). Os pacientes não se encontram abaixo dos 45 anos de idade e, além disso, os resultados referem-se à pele elastótica versus atrófica e não à comparação entre faixas etárias, não tendo diferenças quanto ao sexo.

A alta relação entre a espessura córnea e a espessura total da epiderme mostra que quando a epiderme se espessa (ou sofre atrofia), isto se reflete na espessura da camada córnea, na pele fotoexposta. SAYRE, *et al*(1981), descreveram o fenômeno de climatização entre os indivíduos que sofrem exposição solar durante o verão, possibilitando uma melhor resposta à radiação solar do que os indivíduos que não sofreram fotoexposição. Parte dessa climatização é devida ao espessamento gradual da epiderme, especialmente da camada córnea.

Ainda referente à espessura da epiderme, este estudo também mostrou correlação entre as diferentes camadas, demonstrando desse modo que se pode inferir o que ocorre com a epiderme a partir da análise de apenas uma das camadas, espinhosa, granulosa ou córnea, na pele fotoexposta, ao contrário de certas condições em que apenas uma das camadas está alterada, como no caso das queratodermias.

Em relação aos fototipos, ANDREASSI, *et al* (1990) afirmam ser a cor da pele constitucional o parâmetro mais significativo para determinar o fototipo. Isto também foi relatado por RAMPEN *et al* (1988) em seu estudo demonstrando o fato da auto-avaliação da capacidade de bronzear ou queimar não ser fidedigna.

NÜRNBERGER *et al* (1978), enquanto estudava a elastose solar na pele negra, mostrou que não havia elastose na derme profunda e nem nas áreas cobertas. Extrapolando para este atual estudo, pode-se considerar a porção superior da coxa como um bom parâmetro para área coberta, em virtude de não se ter encontrado material elastótico nesse local.

TSUJI & SAWABE (1987) estudaram fibras elásticas no tecido cicatricial e verificaram que o tecido cicatricial atrófico continha mais fibras positivas ao Weigert e menos fibras elásticas finas do que o tecido cicatricial hipertrófico. Este estudo auxilia na tentativa de entender a discrepância dos achados clínicos evidentes com a ausência de correspondente morfológico significativo nesta amostra, pois é surpreendente o tecido cicatricial atrófico demonstrar coloração mais intensa ao Weigert, se comparado a um tecido cicatricial hiperplásico.

FISHER *et al.*(1997) mostraram que mesmo uma única exposição à irradiação ultravioleta aumentava a atividade de três metaloproteinases responsáveis por significativa degradação de fibras de colágeno tipo I, as de maior concentração na derme do adulto. Essas enzimas de degradação podem ter importante papel na perda de colágeno, como foi observado na região exposta dos indivíduos aqui estudados (A expressão do gene da elastina está marcadamente ativada nas células da derme fotodanificada).

JUNQUEIRA *et al.*(1983) mostraram que o colágeno tipo III é encontrado principalmente na derme papilar, enquanto o colágeno tipo I predomina na derme reticular (nas camadas mais profundas). As principais alterações das fibras dérmicas ocorrem na porção superficial da derme reticular.

NELSON *et al.* (1994) mostraram que na pele fotodanificada há redução da síntese de colágeno tipo I. O colágeno de reparação produzido na região subepidérmica após dermabrasão tem provável origem do colágeno I, com aumento do pró-colágeno. Poder-se-ia inferir, portanto, que na pele fotoenvelhecida a diminuição do colágeno se dá tanto por destruição do colágeno III, quanto por déficit na produção de colágeno I, que estaria presente na zona subepidérmica. Todavia, não se pode garantir que não haja também degradação destas fibras.

PETERSEN, HANSEN e CRAIG (1992) mostraram que irradiação UVA estimula a produção de collagenase, que é responsável pela degradação das fibras colágenas, contribuindo para a diminuição do teor colagênico da derme, com conseqüente diminuição do volume da derme como um todo. Na pele humana, foi demonstrado *in vitro* que, tanto os fibroblastos quanto os queratinócitos sintetizam e secretam collagenase. A atividade da collagenase é inibida pelo inibidor tecidual de metaloproteinases, também responsável pela

degradação do colágeno. O fato de haver síntese e secreção pelo queratinócito auxilia na compreensão da unidade dermoepidérmica como compartimento dinâmico e interrelacionado.

COULOMB, LEBRETON e DUBERTRET (1989) mostraram que o crescimento epidérmico sofria acentuação quando a matriz colágena tinha sido previamente reorganizada por fibroblastos e era mais intensa quando fibroblastos viáveis persistiam nessa matriz. Concluíram, portanto, que a função dos fibroblastos não se restringia somente à síntese e degradação da matriz extracelular, mas também para regular a epidermização ; por um lado remodelando as fibras colágenas e por outro lado secretando fatores difundíveis que promovem crescimento epidérmico. Este estudo ajuda a compreender a relação existente entre as áreas da pele e seus fatores dependentes. Na regressão múltipla, foi possível observar que a área da epiderme entre os três locais [região exposta (A), parcialmente exposta (B) e coberta (C)] foi maior em A, e isso se deu basicamente à custa da espessura da epiderme, com coeficiente de determinação de 30%; foi acentuado pelas fibras colágenas positivamente, aumentando essa determinação para 40,3% e foi refreado pelas fibras elásticas, deixando um coeficiente de determinação final de 45,1%. Na área coberta, a área da epiderme dependeu da espessura da espinhosa, com coeficiente de determinação de 28,6% e a área da derme contribuiu para refrear num total de 34,5% de determinação.

Quando se enfoca a razão das áreas, houve significância com padrão de pele na região exposta e a razão epiderme/ derme, como já citado na análise estatística, havendo, portanto, correlação das duas para determinar a tendência a padrão elastótico ou a atrófico.

Quanto à relação entre a espessura ou área da epiderme e/ou derme, quantidade de fibras colágenas ou elásticas e o substrato dos padrões atrófico e elastótico, padrões estes tão bem discerníveis à inspeção semiológica, não foi possível observar diferenças significativas nessas medidas. Talvez a diferença nos padrões esteja relacionada a uma configuração tridimensional que a unidade dermoepidérmica possa apresentar, como um relevo cutâneo ondulado, na pele de padrão elastótico, como também tentou explicar o estudo de IMAYAMA & BRAVERMAN (1989) em relação ao envelhecimento, uma alteração no arranjo tridimensional da malha composta pelas fibras colágenas e elásticas do tecido conectivo.

Em relação aos queratinócitos melanizados e sua associação com sexo masculino, isto pode ser interpretado como maior exposição solar (a faixa etária avaliada), pelo tipo de trabalho (embora a mulher também tenha exposição, nessa faixa etária a força de trabalho era predominantemente masculina- > 50 anos; atualmente, com a mulher nas frentes de trabalho, talvez se observe uma modificação nessa associação.



5. CONCLUSÃO

Conclusão: Na amostra estudada (pele crônica e intensamente exposta ao sol), foi observado que: a) indivíduos caucasóides apresentam propensão crescente a desenvolver neoplasias cutâneas, à medida que o tempo de exposição se prolonga e não há diferença significativa de risco entre os diferentes fototipos (I, II, III) e padrões clínicos (elastótico ou atrófico); b) a pele fotodanificada apresenta modificações de espessura e textura dos seus vários elementos, que não diferem, significativamente, entre os diferentes fototipos e padrões clínicos.



6. *SUMMARY*

Photoaging and photodamage are challenging and endless themes. Most of the studies focus on the epidermal features while, others, emphasizes the dermis. However, there have been few studies concerning the intimate correlation between these compartments, which should be considered as a whole: the dermal-epidermal unit, as well as its relation to skin malignancy.

The purpose of the present study was to investigate the association between clinical and histological features of the dermal-epidermal unit on the exposed skin, comparatively to the unexposed skin of the same individuals with Milian's citrine skin or its atrophic variant, within Fitzpatrick's phototypes I, II, and III.

The study was based on outdoor workers, who presented two basic clinical patterns of skin photodamage, atrophic and elastotic, with phototypes varying from I to III. There were 61 volunteers over 45 years , and all signed an informed consent. Five-mm punch biopsies of tumor-free exposed (dorsal aspect of the forearm), partially exposed (the inner aspect of the arm), and non-exposed (upper thigh) skin were performed. The subjects were screened, and divided into groups, according to their phototypes, clinical features of their sun damaged skin (atrophic or elastotic), and the presence or absence of skin tumors on any other skin site. Measurement of the epidermal and dermal areas were evaluated by means of a computer-assisted image analysis (KS 300, Carl Zeiss Inc). Stereological study of the dermis was made through a cycloid reticulum (for elastic fibers) and a segmented reticulum (for collagen fibers), settled on a 10x Zeiss ocular lens. The basement membrane zone was studied through PAS and immunohistochemical stain (collagen IV) . The following aspects were evaluated: epidermal thickness and area, dermal area, elastic tissue amount, collagen fiber amount, melanin-rich keratinocyte number, granular layer cell number, and basement membrane thickness and continuity.

The variables analyzed were: clinical pattern (trend to elastosis or to atrophy), age, sex, phototype, and presence or absence of skin tumors.

Results: On the subset of caucasoid individuals examined, which were chronically and intensely sun-exposed, the statistic analisys revealed significant correlation between:

a) clinical pattern and phototype: the smaller the phototype, the higher the intensity of skin atrophy;

b) sex and melanin-enriched keratinocytes at the exposed area: the chronically sun-exposed skin presents irregular distribution of pigmentation, significantly enhanced among male individuals;

c) presence of neoplasias and age: the frequency of cutaneous neoplasias is progressive with ageing; the deleterial effect of the sun is cumulative among caucasoids of any phototype and any clinical pattern of photodamage;

d) age and skin thickness: in conformity with what is already well documented, the chronically sun-exposed epidermis is thicker than the partially-exposed or the unexposed one; however, there was a negative correlation between age and its thickness at the chronically sun-exposed region. In other words, even at the photodamaged area, progressive epidermal atrophy occurs with age;

e) epidermal area and dermal area: the total epidermal-dermal area of the arm's skin was smaller than the area of the forearm, and this one smaller than the thigh's, and the epidermal measures were inversely proportional to the dermis. In other way, in areas where the dermis is thicker, the epidermis is slimmer;

f) clinical pattern and collagen content at the unexposed area: at the covered skin, the number of collagen fibers of the reticular dermis is significantly smaller at the individuals with atrophic pattern, relatively to the elastotic ones;

g) age and dermal area at the inner portion of the arm: the older the age, the smaller the dermal area; in other words, at this anatomic site, progressive dermal atrophy occurs with ageing.

There was no correlation between:

a) **clinical pattern (atrophic or elastotic) and : 1- age; 2- sex; 3- any other counting or dermal and epidermal measures:** once the differences between the patterns (atrophic or elastotic), so clinically apparent, did not have thickness or dermal or epidermal areas' embasement , neither at the collagen , nor at the elastic content, one can suppose that there is a difference at the spatial configuration of the elastotic skin, which would have, eventually, a wavier aspect than the atrophic skin;

b) **the phototype (I,II,III) and: 1- age; 2- sex; 3- any other countings or dermal or epidermal measures;**

c) **the presence of neoplasias and phototype or clinical pattern:** there was no significant difference between the presence or absence of tumor and: 1- phototype (I,II,III); 2- clinical pattern (atrophic or elastotic);

d) **basement membrane zone measures and photoexposion:** there was no significant difference between the basement membrane zone's thickness at the exposed, partially-exposed and unexposed skin areas.

All of the other findings are in conformity with the descriptions in the literature.

Conclusion: On the studied subset (chronic and intensely sun-exposed skin), it was observed that: a) caucasoid individuals present increasing propension to develop cutaneous tumors as time exposion lengthens and there is no significant risk among the different phototypes (I,II,III) and clinical patterns (atrophic or elastotic); b) the photodamaged skin shows thickness modifications and textureof its various elements, which do not differ, significantly, among the different phototypes and clinical patterns.



7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADHOUTE, H. ; de RIGAL, J. ; MARCHAND, J. P.; PRIVAT, Y. ; LEVEQUE, J.L. - Influence of age and sun exposure on the biophysical properties of the human skin: an *in vivo* study. **Photodermatol Photoimmunol Photomed**, 9: 99-103, 1992.
- ANDREASSI, L.; CASINI, L.; SIMONI, S.; BARTALINI, P.; FIMIANI, M. - Measurement of cutaneous colour and assessment of skin type. **Photodermatology, Photoimmunology, Photomedicine**, 7: 20-4, 1990.
- BEITNER,H. - Clinical and experimental aspects of long-wave ultraviolet (UVA) irradiation of human skin. [Tese] **Acta Dermato-Venereologica**, suppl 123. Estocolmo, 1986.
- BHAWAN, J. ; ANDERSEN, W. ; LEE, J.; LABADIE, R.R.; SOLARES, G. - Photoaging versus intrinsic aging: a morphologic assessment of facial skin. **J Cutan Pathol**, 22: 154-9, 1995.
- BILLINGHAM, R. E. & SILVERS, W. K. - Transplantation and cutaneous genetics. **J Invest Dermatol**, 509-15,1973.
- BOLOGNIA, J.L. - Aging Skin. **The American Journal of Medicine**, 98 (suppl 1A): S99-103, 1995.
- BOYD, A.S. ; NAYLOR, M. ; CAMERON, G.S. ; PEARSE, A.D. ; GASKELL, S.A. ; NELDNER, K.H. - The effects of chronic sunscreen use on the histologic changes of dermatoheliosis. Clinical and Laboratory Studies. **J Am Acad Dermatol**, 33: 941-6, 1995.
- BRANCHET, M.C. ; BOISNIC, S. ; FRANCES, C.; ROBERT, A.M. - Skin thickness changes in normal aging skin. **Gerontology**, 36: 28-35, 1990.
- BRAVERMAN, I. M. & FONFERKO, E. - Studies in cutaneous aging : I. The elastic fiber network. **J Invest Dermatol**, 78: 434-43, 1982.
- CALANCHINI-POSTIZZI,E. & FRENK, E. - Long-term actinic damage in sun-exposed vitiligo and normally pigmented skin. **Dermatologica**,174: 266-71, 1987.
- CALDERONE, D.C. & FENSKE, N.A. - The clinical spectrum of actinic elastosis. Clinical Review. **J Am Acad Dermatol**,32: 1016-24, 1995.

- CERIMELE, D. ; CELLENO, L. ; SERRI, F. - Physiological changes in ageing skin. **British Journal of Dermatology**, 122 (suppl 35): 13-20, 1990.
- CHEN, V. L. ; FLEISCHMAJER, R. ; SCHWARTZ, E.; MARIE PALAIA, M.A.; TIMPLE, R. - Immunohistochemistry of elastotic material in sun-damaged skin. **J Invest Dermatol**, 87: 334-7, 1986.
- COTTA-PEREIRA,G. ; GUERRA, R. & BITTENCOURT-SAMPAIO, S. - Oxytalan, elaunin, and elastic fibers in the human skin. **J Invest Dermatol**, 66: 143-8, 1976.
- COULOMB, B.; LEBRETON, C.; DUBERTRET, L. - Influence of human dermal fibroblasts on epidermalization. **J Invest Dermatol**, 92: 122-5, 1989.
- DAYAN, D. ; HISS, Y. ; HIRSCHBERG, A.; BUBIS, J.J.; WOLMAN, M. - Are the polarization colors of Picrosirius red-stained collagen determined only by the diameter of the fibers? **Histochemistry**, 93: 27-9, 1989.
- FAZIO, M. J. ; OLSEN, D. R. ; UITTO, J. J. - Skin aging: lessons from cutis laxa and elastoderma. **Cutis**, 43: 437-44,1989.
- FENSKE, N.A. & LOBER, C.W. - Structural and functional changes of normal aging skin. **J Am Acad Dermatol**, 15: 571-85, 1986.
- FISHER,G. J.; WANG, Z. Q.; DATTA, S. C.; VARANI, J.; KANG, S. - Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light. **The New England Journal of Medicine**,13: 1419-28, 1997.
- FITZPATRICK, T.B. - Ultraviolet-induced pigmentary changes: benefits and hazards. **Current Problems in Dermatology**,15: 25-38,1986.
- FITZPATRICK, T.B. - The validity and practicality of sun-reactive skin types I through VI. **Arch Dermatol**, 124: 869-71, 1988 [Editorial].
- FLOTTE, T. J. ; SEDDON, J. M. ; ZHANG, Y.; GLYNN, R.J.; EGAN, K.M.; GRAGOUDAS, E.S. - A computerized image analysis method for measuring elastic tissue. **J Invest Dermatol**, 93: 358-62, 1989.

- FOELLMER, H.G. ; MADRI, J.A.; FURTHMAYR, H. - Methods in laboratory investigation- Monoclonal antibodies to type IV collagen: Probes for the study of structure and function of basement membranes. **Laboratory Investigation** ,48: 639-49, 1983.
- FONSECA, A. & SOUZA, E. M. - **Dermatologia Clínica**. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1984, 642p.
- GARMIN, M. ; YAAR, M. ; BOILEAU, N.; BACKENDORF, C.; GILCHREST, B.A. - Effect of aging and habitual sun exposure on the genetic response of cultured keratinocytes to solar-simulated irradiation. **J Invest Dermatol**, 99: 743-8, 1992.
- GILCHREST, B. A. - Skin aging and photoaging : an overview. **J Am Acad Dermatol**, 21: 610-3, 1989.
- GILCHREST, B. A. & YAAR, M. - Ageing and photoageing of the skin: observations at the cellular and molecular level. **Br J Dermatol** ,127 (suppl 4): 25-30, 1992.
- GILCHREST, B. A. - A review of skin ageing and its medical therapy. **Br J Dermatol**, 135: 867-75, 1996.
- GUNDERSEN, H. J. G. ; BAGGER, P. ; BENDTSEN, T. F.; EVANS, S.M.; KORBO, L.; MARCUSSEN, N.; MØLLER, A.; NIELSEN, K.; NYENGAARD, J.R.; PAKKENBERG, B.; SØRENSEN, F.B.; VESTERBY, A.; WEST, M.J. - The new stereological tools: disector, fractinator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. **APMIS**,96: 857-81, 1988.
- GUSTERSON, B. A. ; Warburton, M. J. ; MITCHELL, D.; KRAFT, N.; HANCOCK, W.W. - Invading squamous cell carcinoma can retain a basal lamina - An immunohistochemical study using a monoclonal antibody to type IV collagen. **Laboratory Investigation**, 51: 82-7, 1984.
- GUSTERSON, B. A. ; CLINTON, S.; GOUGH, G. - Studies of early invasive and intraepithelial squamous cell carcinomas using an antibody to type IV collagen. **Histopathology**, 10: 161-9, 1986.

- HAVENITH, M. G. ; CLEUTJENS, J. P. M. ; BEEK, C.; LINDEN, E.V.D.; DE GOEIJ, A.F.P.M.; BOSMAN, F.T. -Human specific anti-type IV collagen monoclonal antibodies, characterization and immunohistochemical application. **Histochemistry**, 87: 123-8, 1987.
- HAVENITH, M. G. ; DINGEMANS, K. P. ; CLEUTJENS, J.P.M.; WAGENAAR, S.S.; BOSMAN, F.T. - Basement membranes in bronchogenic squamous cell carcinoma : an immunohistochemical and ultrastructural study. **Ultrastructural Pathology**, 14: 51-63, 1990.
- HÖLZLE, E. - Pigmented lesions as a sign of photodamage. **Br J Dermatol**, 127 (suppl 41): 48-50, 1992.
- IMAYAMA, S. & BRAVERMAN, I. - A hypothetical explanation for the aging of skin: Chronologic alteration of the three-dimensional arrangement of collagen and elastic fibers in connective tissue. **Am J Pathol**, 134: 1019-25, 1989.
- JUNQUEIRA, L. C. U. ; BIGNOLAS, G.; BRENTANI, R. R. - Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. **Histochemical Journal** , 11: 447-55, 1979.
- JUNQUEIRA, L. C. U. ; MONTES, G. S.; SANCHEZ, E. M. - The influence of tissue thickness on the study of collagen by the Picrosirius - Polarization method. (Short communication) **Histochemistry**, 74: 153-6, 1982.
- JUNQUEIRA, L. C. U. ; MONTES, G. S. ; MARTINS, J. E. C.; JOAZEIRO, P.P. - Dermal collagen distribution: An histochemical and ultrastructural study. **Histochemistry**, 79:397-403, 1983.
- KLIGMAN, A. M. ; GROVE, G. L. ; HIROSE, R.; LEYDEN, J.J. - Topical tretinoin for photoaged skin. **J Am Acad Dermatol**,15: 836-59, 1986.
- KLIGMAN, L. - The ultraviolet-irradiated hairless mouse: a model for photoaging. **J Am Acad Dermatol**, 21: 623-31, 1989.
- KOCHEVAR, I. E. ; MORAN, M.; GRANSTEIN, R. D. - Experimental photoaging in C3H/HeN, C3H/HeJ, and Balb/c mice: comparison of changes in extracellular matrix components and mast cell numbers. **J Invest Dermatol**, 103: 797-800, 1994.

- KURBAN, R. S. & BHAWAN, J. - Histologic changes in skin associated with aging. **J Dermatol Surg Oncol**, 16: 908-914, 1990.
- LANDMAN, Gilles - **Estudo das fibras oxitalânicas da pele não exposta ao sol: variações quantitativas em diferentes faixas etárias e grupos sexuais**. São Paulo, 1991. [Tese - Doutorado - Universidade de São Paulo].
- LAPIÈRE, C. M. - The ageing dermis: the main cause for the appearance of 'old' skin. **Br J Dermatol**, 122 (suppl 35): 5-11, 1990.
- LAVKER, R. M. - Structural alterations in exposed and unexposed aged skin. **J Invest Dermatol**, 73: 59-66, 1979.
- LEDOUX-CORBUSIER, M. & ACHTEN, G. - Elastosis in chronic radiodermatitis: An ultrastructural study. **Br J Dermatol**, 91: 287-95, 1974.
- LEFFEL, D. J. ; STETZ, M. L. ; MILSTONE, L. M.; DECKELBAUM, L.I. - In vivo fluorescence of human skin - A potential marker of photoaging. **Arch Dermatol**, 124: 1514-8, 1988.
- LEYDEN, J. J. - Clinical features of ageing skin. **Br J Dermatol** ,122 (suppl 35): 1-3, 1990.
- LOBER, C.W. & FENSKE, N.A. - Photoaging and the skin: Its clinical differentiation and meaning. **Geriatrics**, 45: 36-42, 1990.
- LOWE, N. J. ; MEYERS, D. P. ; WIEDER, J. M.; LUFTMAN, D.; BORGETT, T.; LEHMAN, M.D.; JOHNSON, A.W.; SCOTT, I.R. - Low doses of repetitive ultraviolet A induce morphologic changes in human skin. **J Invest Dermatol**, 105: 739-43, 1995.
- LU, H. ; EDWARDS, C. ; GASKELL, S.; PEARSE, A.; MARKS, R. - Melanin content and distribution in the surface corneocyte with skin phototypes. **Br J Dermatol**, 135: 263-7, 1996.
- MARKS, M. W. ; MORYKWAS, M. D.; WHEATLEY, M. J. - Fibroblast-mediated contraction in actinically exposed and actinically protected aging skin.. **Plast Reconstr Surg**, (Aug): 255-9, 1990.

- MERA, S. L. ; LOVELL, C. R. ; JONES, R. R.; DAVIES, J.D. - Elastic fibres in normal and sun-damaged skin: an immunohistochemical study. **Br J Dermatol**, 117: 21-7, 1987.
- MITRANI, E. - Possible role of connective tissue in epidermal neoplasia. **Br J Dermatol**, 99: 233-44, 1978.
- MONTAGNA, W.; KIRCHNER, S.; CARLISLE, K. - Histology of sun-damaged human skin. **J Am Acad Dermatol**, 21: 907-18, 1989.
- MONTAGNA, W. & CARLISLE, K. - Structural changes in ageing skin. **Br J Dermatol**, 1990; 122 (suppl 35): 61-70, 1990.
- MONTAGNA, W. & CARLISLE, K. - The architecture of black and White facial skin. **J Am Acad Dermatol**, 24: 929-37, 1991.
- MORAGAS, A. ; GARCIA-BONAFÉ, M. ; SANS, M. ; TORÁN, N. ; HUGUET, P. ; MARTÍN-PLATA, C. – Image analysis of dermal collagen changes during skin aging. **Analyt Quant Cytol Histol**, 20: 493-9, 1998.
- NAKAMURA, K. & JOHNSON, W. C. -Ultraviolet light induced connective tissue changes in rat skin: a histopathologic and histochemical study. **J Invest Dermatol**, 51: 253-8, 1968.
- NELSON, B. R. ; MALMUDAR, G. ; GRIFFITHS, C. E. M.; GILLARD, M.O.; DIXON, A.E.; TAVAKKOL, A.; HAMILTON, T.A.; WOODBURY, R.A.; VOORHEES, J.J.; JOHNSON, T.M. - Clinical improvement following dermabrasion of photoaged skin correlates with synthesis of collagen I. **Arch Dermatol**, 130: 1136-42, 1994..
- NÜRNBERGER, F. ; SCHÖBER, E. ; MARSCH, W. C.; DOGLIOTTI, M. - Actinic elastosis in black skin. **Arch Dermatol Res**, 262: 7-14, 1978.
- OIKARINEN, A. - The aging of skin : chronoaging versus photoaging. (editorial) **Photodermatol Photoimmunol Photomed**, 7: 3-4, 1990.
- OLSON, R. L. ; GAYLOR, J.; EVERETT, M. A. - Skin color, melanin, and erythema. **Arch Dermatol**, 108: 541-4, 1973.

- PATHAK, M.A., NGHIEM, P., FITZPATRICK, T.B. - Acute and chronic effects of the sun. In: FITZPATRICK, T.B., EISEN, A.Z., WOLFF, K., FREEDBERG, I.M., AUSTEN, K.F. - **Dermatology in General Medicine**. 5 ed. New York, McGraw-Hill, 1999, p.1598-1607.
- PETERSEN M. J. ; HANSEN, C.; CRAIG, S. - Ultraviolet A irradiation stimulates collagenase production in cultured human fibroblasts. **J Invest Dermatol**, 99: 440-4, 1992.
- PIHLMAN, K. & LINDER, E. - Fluorescence microscopical visualization of elastic fibres using basic fuchsin. **Histochemistry**, 79: 157-65, 1983.
- PROPHET, E.B., MILLS, B., ARRINGTON, J.B., SOBIN, L.H. - **Metodos histotécnicos**. Instituto de Patologia de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América (AFIP), 1995.
- PUTCHLER, H. ; MELOAN, S. N. & WALDROP, F. S. - Are Picro-dye reactions for collagen quantitative? Chemical and histochemical considerations. **Histochemistry**, 88: 243-56, 1988.
- RAMPEN, F. H. J. ; FLEUREN, A. M. ; de BOO, T. M.; LEMMENS, WAJG- Unreliability of self-reported burning tendency and tanning ability. **Arch Dermatol**, 124: 885-8, 1988.
- ROGERS, G. S. & GILCHREST, B. A. - The senile epidermis: environmental influences on skin ageing and cutaneous carcinogenesis. **Br J Dermatol**, 122 (suppl 35): 55-60, 1990.
- RONGIOLETTI, F. & REBORA, A. - Fibroelastolytic patterns of intrinsic skin aging: pseudo-xanthoma-elasticum-like papillary dermal elastolysis and white fibrous papulosis of the neck. **Dermatology**, 191: 19-24, 1995.
- SAMS, W. M. ; SMITH, J. G.; BURK, P. G. - The experimental production of elastosis with ultraviolet light. **J Invest Dermatol**, 43: 467-71, 1964

- SAYRE, R. M. ; DESROCHERS, D. L. ; WILSON, C. J.; MARLOWE, E. - Skin type, minimal erythema dose (MED) , and sunlight acclimatization. **J Am Acad Dermatol**, 5: 439-43, 1981.
- SCHELLANDER, F. & MARKS, R. - The epidermal response to subepidermal inflammation. **Br J Dermatol**, 88: 363-7, 1973.
- SCHWARTZ, E. ; CRUICKSHANK, F. A. ; CHRISTENSEN, C. C.; PERLISH, J.S.; LEBWOHL, M. - Collagen alterations in chronically sun-damaged human skin. **Photochem Photobiol**, 58: 841-4, 1993.
- SMITH, J. G. ; DAVIDSON, E. A. ; MITCHELL, W.; SAMS Jr., W.M.; CLARK, R.D. - Alterations in human dermal connective tissue with age and chronic sun damage. **J Invest Dermatol**, 39: 347-50, 1962.
- STERN, R. S. & MOMTAZ, K. - Skin typing for assessment of skin cancer risk and acute response to UV-B and oral methoxsalen photochemotherapy. **Arch Dermatol**, 120: 869-73, 1984.
- SUETAKE, T.; SASAI, S.; ZHEN, Y-X.; OHI, T.; TAGAMI, H.- Functional analysis of the stratum corneum in scars: sequential studies after injury and comparison among keloids, hypertrophic scars, and atrophic scars. **Arch Dermatol**, 132: 1453-8, 1996.
- TALWAR, H. S. ; GRIFFITHS, C. E. M. ; FISCHER, G. J.;HAMILTON, T.A.; VOORHEES, J.J. - Type I and III collagen precursors are reduced in severe chronically photodamaged human skin. **J Invest Dermatol**, 102: 622,1994. (Abstract,590)
- TAYLOR, C. R. ; STERN, R. S. ; LEYDEN, J J.; GILCHREST, B.A. - Photoaging/ photodamage and photoprotection. **J Am Acad Dermatol**, 22: 1-15, 1990.
- TIZIANI, V. - Aspectos morfológicos dos gânglios linfáticos em animais tratados com silicona gel- estudo empregando microscopia óptica e morfometria auxiliada por computador. Campinas, 1995. [Tese - Doutorado – Unicamp]

- TSUJI, T.; YORIFUJI, T.; HAYASHI, Y.; HAMADA, T. – Light and scanning electron microscopic studies on wrinkles in aged persons' skin. **Br J Dermatol**, 114: 329-35, 1986.
- TSUJI, T. & SAWABE, M. - Elastic fibers in scar tissue: scanning and transmission electron microscopic studies. **J Cutan Pathol**, 14: 106-13, 1987.
- TSUJI, T. – A new elastic system component, 'elastic sheet' in the human dermis. An electron microscopic study. **Br J Dermatol**, 118: 347-52, 1988.
- TUAN, T.L.; KELLER, L.C.; SUN, D.; NIMNI, M.E.; CHEUNG, D. - Dermal fibroblasts activate keratinocyte outgrowth on collagen gels. **J Cell Sci**, 107: 2285-9, 1994.
- UITTO, J. ; FAZIO, M. J. ; OLSEN, D. R. - Molecular mechanisms of cutaneous aging. Age-associated connective tissue alterations in the dermis. **J Am Acad Dermatol**, 21: 614-22, 1989.
- VITTELLARO-ZUCCARELLO, L.; CAPELETTI, S.; DAL POZZO ROSSI, V.; SARI-GORLA, M.- Stereological analysis of collagen and elastic fibers in the normal human dermis: variability with age, sex, and body region. **The anatomical record**, 238: 153-62, 1994.
- WARREN, R. ; GARTSTEIN, V. ; KLIGMAN, A. M.; MONTAGNA, W.; ALLENDORF, R.A.; RIDDER, G.M. - Age, sunlight and facial skin: a histologic and quantitative study. **J Am Acad Dermatol**, 25: 751-60, 1991.
- YAMAMOTO, O.; BHAWAN, J.; SOLARES, G.; TSAY, A.W.; GILCHREST, B.A. - Ultrastructural effects of topical tretinoin on dermo-epidermal junction and papillary dermis in photodamaged skin. A controlled study. in hairless mouse skin: a comparison to UVB-induced damage. **J Invest dermatol**, 100: 194-9, 1993. **Experimental Dermatology**, 1995; 4:146-54.
- ZHENG, P. & KLIGMAN, L. - UVA-induced ultrastructural changes in hairless mouse skin: a comparison to UVB-induced damage. **J Invest dermatol**, 100: 194-9, 1993.



8. *ANEXOS*

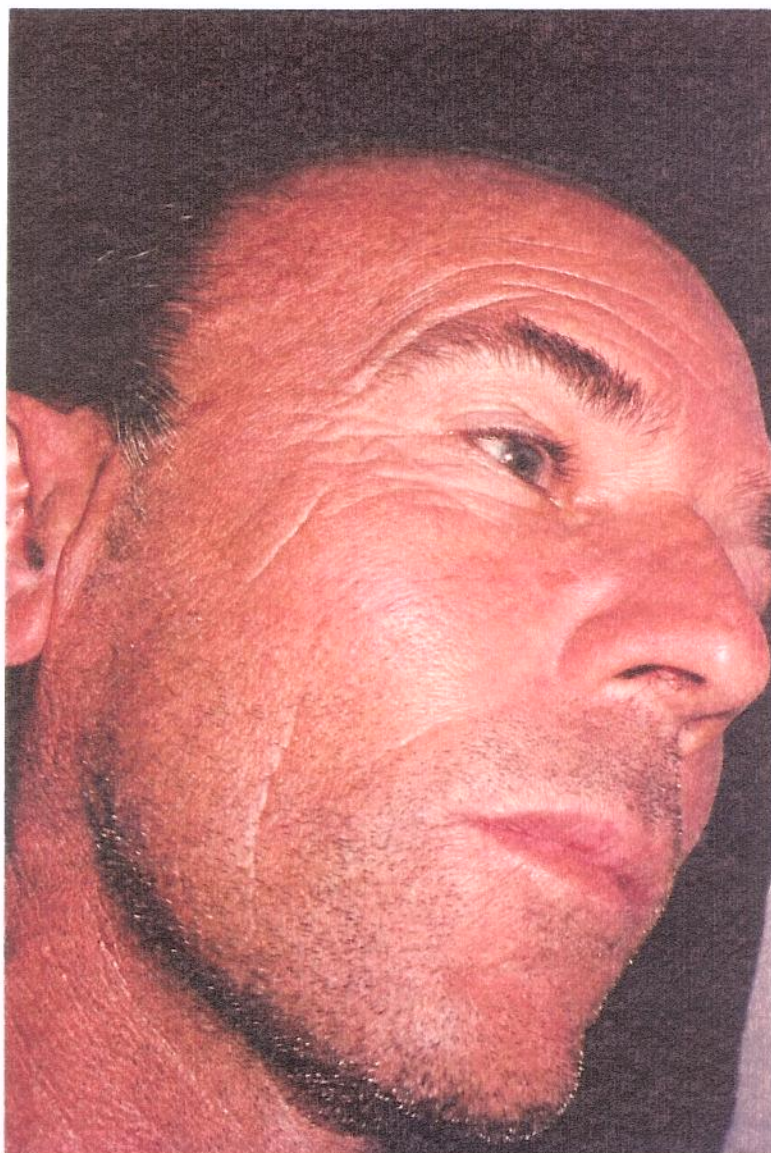


Foto 1: Exemplo de padrão clínico elastótico, fototipo II



Foto 2: Exemplo de padrão clínico elastótico, fototipo I

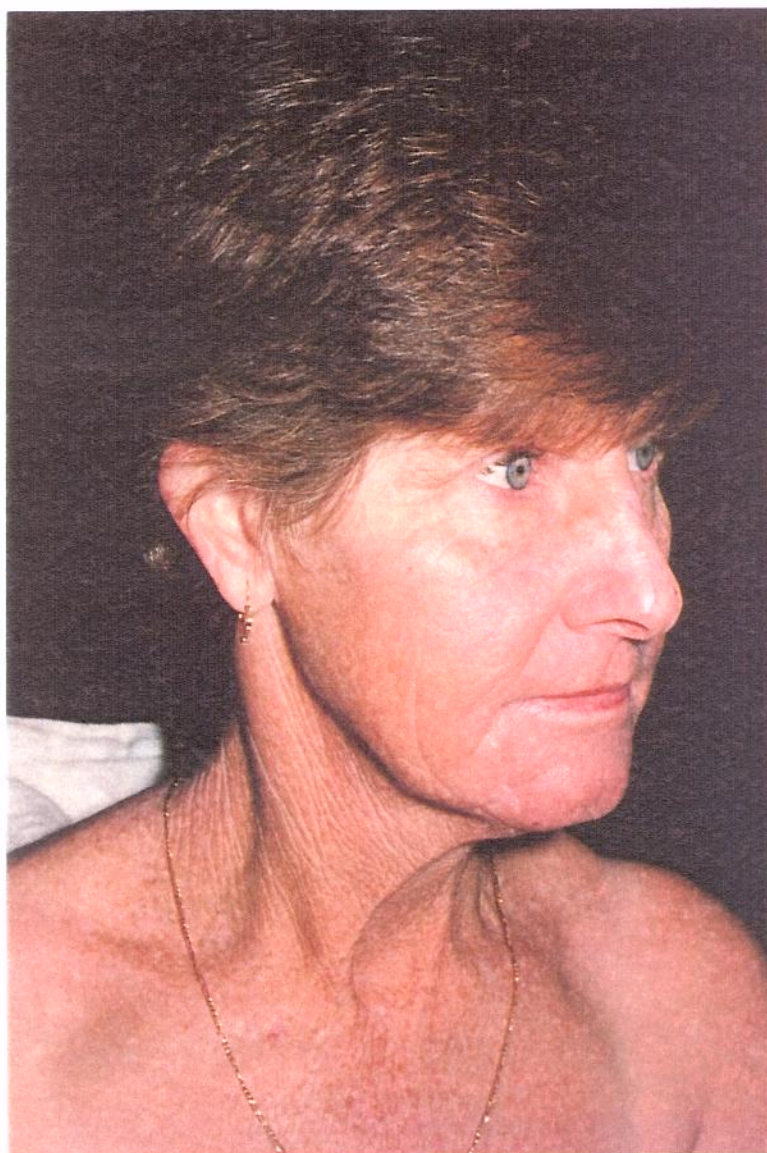


Foto 3: Exemplo de padrão clínico atrófico, fototipo I

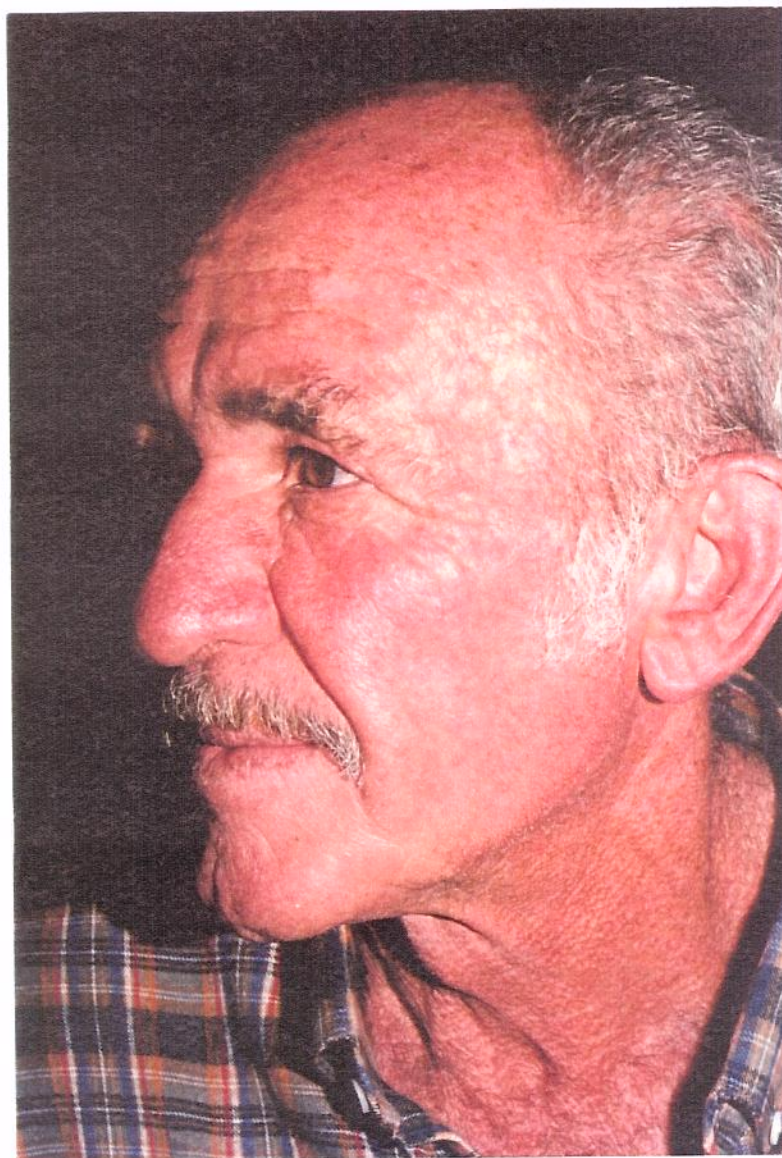


Foto 4: Exemplo de padrão clínico atrófico, fototipo I

Tabela 1: Medida da espessura total da epiderme nas diferentes áreas de exposição solar, de acordo com o fototipo e com aspecto clínico predominante de elastose

Espessura Total Elastose	Fototipo I (n=6)	Fototipo II (n=15)	Fototipo III (n=12)
Área exposta	0,110 ± 0,014	0,117 ± 0,032	0,124 ± 0,037
Área parcialmente exposta	0,092 ± 0,015	0,086 ± 0,017	0,092 ± 0,022
Área coberta	0,107 ± 0,019	0,097 ± 0,014	0,093 ± 0,017

Tabela 2: Medida da espessura total da epiderme nas diferentes áreas de exposição solar, de acordo com o fototipo e com aspecto clínico predominante de atrofia

Espessura Total Atrofia	Fototipo I (n=12)	Fototipo II (n=12)	Fototipo III (n=3)
Área exposta	0,113 ± 0,021	0,115 ± 0,026	0,115 ± 0,008
Área parcialmente exposta	0,086 ± 0,014	0,089 ± 0,020	0,095 ± 0,025
Área coberta	0,098 ± 0,010	0,103 ± 0,017	0,108 ± 0,040

Tabela 3: Medida da área da epiderme nos diferentes locais de exposição solar, de acordo com o fototipo. Aspecto clínico predominante de elastose

Área da epiderme Elastose	Fototipo I (n=6)	Fototipo II (n=15)	Fototipo III (n=10)
Área exposta	0,142 ± 0,026	0,130 ± 0,030	0,134 ± 0,029
Área parcialmente exposta	0,112 ± 0,022	0,102 ± 0,024	0,107 ± 0,019
Área coberta	0,140 ± 0,034	0,111 ± 0,025	0,114 ± 0,021

Tabela 4: Medida da área da epiderme nos diferentes locais de exposição solar, de acordo com o fototipo. Aspecto clínico predominante de atrofia

Área da epiderme	Fototipo I	Fototipo II	Fototipo III
Atrofia	(n=12)	(n=12)	(n=3)
Área exposta	0,128 ± 0,037	0,111 ± 0,018	0,132 ± 0,051
Área parcialmente exposta	0,102 ± 0,028	0,104 ± 0,025	0,135 ± 0,030
Área coberta	0,111 ± 0,027	0,113 ± 0,026	0,130 ± 0,013

Tabela 5A e B: Medida da espessura córnea nas diferentes áreas de exposição solar, de acordo com o fototipo e com respectivo aspecto clínico predominante de elastose e de atrofia

Espessura córnea	Fototipo I	Fototipo II	Fototipo III
Elastose	(n=6)	(n=15)	(n=12)
Área exposta	0,049 ± 0,011	0,062 ± 0,023	0,072 ± 0,031
Área parcialmente exposta	0,037 ± 0,013	0,043 ± 0,015	0,041 ± 0,012
Área coberta	0,041 ± 0,018	0,047 ± 0,015	0,042 ± 0,014
Atrofia	(n=12)	(n=13)	(n=3)
Área exposta	0,057 ± 0,021	0,066 ± 0,027	0,047 ± 0,008
Área parcialmente exposta	0,043 ± 0,014	0,046 ± 0,015	0,031 ± 0,008
Área coberta	0,045 ± 0,014	0,053 ± 0,015	0,059 ± 0,037

Tabela 6A: Medida do número de camadas de células da granulosa nas diferentes áreas de exposição solar, de acordo com o fototipo, com aspecto clínico predominante de elastose

Camada granulosa Elastose	Fototipo I (n=12)	Fototipo II (n=15)	Fototipo III (n=12)
Área exposta	1,866 $\pm$ 0,393	2,146 $\pm$ 0,417	2,100 $\pm$ 0,501
Área parcialmente exposta	1,400 $\pm$ 0,379	1,640 $\pm$ 0,372	1,516 $\pm$ 0,386
Área coberta	1,430 $\pm$ 0,427	1,506 $\pm$ 0,291	1,400 $\pm$ 0,295

Tabela 6B: Medida do número de camadas de células da granulosa nas diferentes áreas de exposição solar, de acordo com o fototipo, com aspecto clínico predominante de atrofia

Camada granulosa Atrofia	Fototipo I (n=12)	Fototipo II (n=12)	Fototipo III (n=3)
Área exposta	2,350 $\pm$ 0,436	1,938 $\pm$ 0,435	2,130 $\pm$ 0,115
Área parcialmente exposta	1,533 $\pm$ 0,429	1,560 $\pm$ 0,354	1,200 $\pm$ 0,346
Área coberta	1,566 $\pm$ 0,380	1,380 $\pm$ 0,386	1,266 $\pm$ 0,306

Tabela 7: Medida da espessura da camada espinhosa nas diferentes áreas de exposição solar, de acordo com o fototipo, com aspecto clínico predominante de elastose

Espessura espinhosa Elastose	Fototipo I (n=6)	Fototipo II (n=15)	Fototipo III (n=12)
Área exposta	0,051 $\pm$ 0,006	0,049 $\pm$ 0,016	0,040 $\pm$ 0,009
Área parcialmente exposta	0,035 $\pm$ 0,006	0,035 $\pm$ 0,009	0,042 $\pm$ 0,012
Área coberta	0,049 $\pm$ 0,015	0,040 $\pm$ 0,008	0,043 $\pm$ 0,008

Tabela 8: Medida da espessura da camada espinhosa nas diferentes áreas de exposição solar, de acordo com o fototipo, com aspecto clínico predominante de atrofia

Espessura espinhosa Atrofia	Fototipo I (n=12)	Fototipo II (n=12)	Fototipo III (n=3)
Área exposta	0,044 ± 0,009	0,040 ± 0,007	0,062 ± 0,018
Área parcialmente exposta	0,034 ± 0,007	0,034 ± 0,005	0,055 ± 0,032
Área coberta	0,044 ± 0,008	0,040 ± 0,007	0,042 ± 0,006

Tabela 9: Número de fibras individualizáveis que cruzavam os ciclóides da retícula, na pele predominantemente elastótica

Elastose Fibras Pele elastótica	Fototipo I (n=6)	Fototipo II (n=15)	Fototipo III (n=12)
Área exposta	1,675 ± 0,530	1,465 ± 0,840	1,535 ± 0,633
Área parcialmente exposta	0,796 ± 0,648	0,527 ± 0,421	0,471 ± 0,446
Área coberta	0,373 ± 0,283	0,224 ± 0,346	0,167 ± 0,203

Tabela 10: Número de fibras individualizáveis que cruzavam os ciclóides da retícula, na pele predominantemente atrófica

Pele atrófica	Fototipo I (n=12)	Fototipo II (n=13)	Fototipo III (n=3)
Área exposta	1,469 ± 0,859	1,609 ± 0,845	1,868 ± 0,241
Área parcialmente exposta	0,630 ± 0,306	0,609 ± 0,326	0,429 ± 0,203
Área coberta	0,221 ± 0,216	0,281 ± 0,255 (n=12)	0,394 ± 0,459

Tabela 11: Fibras colágenas verdes que tocavam a retícula segmentada na pele atrófica, nos diferentes fototipos

Colágeno derme Atrofia	Fototipo I (n=12)	Fototipo II (n=13)	Fototipo III (n=3)
Área exposta	0,407 ± 0,209	0,318 ± 0,171	0,406 ± 0,102
Área parcialmente exposta	0,433 ± 0,142	0,481 ± 0,146	0,510 ± 0,151
Área coberta	0,812 ± 0,084	0,810 ± 0,099	0,730 ± 0,091

Tabela 12: Fibras colágenas verdes que tocavam a retícula segmentada na pele elastótica, nos diferentes fototipos

Colágeno derme Elastose	Fototipo I (n=6)	Fototipo II (n=15)	Fototipo II (n=12)
Área exposta	0,251 ± 0,207	0,451 ± 0,197	0,482 ± 0,237
Área parcialmente exposta	0,525 ± 0,085	0,596 ± 0,154	0,524 ± 0,215
Área coberta	0,828 ± 0,094	0,864 ± 0,058	0,836 ± 0,068

Tabela 13: Medidas das áreas da derme, em milímetros quadrados

Área derme Elastose	Fototipo I (n=6)	Fototipo II (n=15)	Fototipo III (n=11)
Área exposta	3,638 ± 1,121	3,721 ± 1,370	3,644 ± 1,158
Área parcialmente exposta	3,269 ± 0,805	3,215 ± 1,067	3,633 ± 1,393
Área coberta	4,384 ± 1,337	4,478 ± 1,439	4,895 ± 1,792
Atrofia	(n=12)		(n=3)
Área exposta	3,829 ± 0,620	4,16 ± 0,933 (n=11)	3,365 ± 0,855
Área parcialmente exposta	3,600 ± 1,111	2,842 ± 0,711 (n=12)	3,600 ± 1,191
Área coberta	4,643 ± 1,409	5,037 ± 0,735 (n=12)	3,916 ± 1,526

Imunoistoquímica para demonstração da membrana basal - (colágeno IV, DAKO, M 785) utilizada na visualização e avaliação da continuidade da membrana basal na pele fotodanificada. Neste caso, foi feita avaliação dos fragmentos de pele exposta (A) e não- exposta (C), não tendo sido feita nos fragmentos de pele parcialmente exposta (B). O observador efetuou toda a reação, desde a silanização das lâminas, até a leitura final e medida da espessura da membrana basal. O método utilizado foi o da estreptavidina-biotina peroxidase.

Descrição da técnica de imunoistoquímica empregada- (foi utilizado como anticorpo primário o monoclonal col.IV, como anticorpo secundário Multilink, capaz de ligar-se ao primário e conjugado à biotina, e o complexo de peroxidase conjugado à estreptavidina e à biotina. A estreptavidina contém quatro sítios para ligação da biotina, sendo que um deles vai ser ocupado pela biotina ligada ao anticorpo secundário e os outros três sítios serão acoplados ao complexo biotina peroxidase da solução).

a. Cortes histológicos: secções de 5 micra foram colocadas em lâminas previamente lavadas e desengorduradas, tratadas com solução de organosilano a 2% em acetona (3-Aminopropil-trietoxi-silano- SIGMA, código A3684). As lâminas com os cortes permanecem à temperatura ambiente até o momento da reação imunoistoquímica.

b. Desparafinização: 1 banho de xilol a 60 graus celsius por 15 minutos e dois banhos de xilol à temperatura ambiente, por 10 minutos cada, para retirar o excesso de parafina.

c. Hidratação: efetuada em gradiente decrescente de álcoois (três banhos de álcool absoluto, dois minutos cada; uma vez em álcool 80% por dois minutos, uma vez em álcool 50% por dois minutos, todos à temperatura ambiente). A seguir, lavagem em água corrente por dois minutos e passagem em água destilada.

d. Inibição da peroxidase endógena: banho em solução a 3% de peróxido de hidrogênio em metanol por 15 minutos, à temperatura ambiente, lavagem em água corrente e passagem por água destilada. Incubação em tampão PBS (phosphate buffer saline, pH 7,6).

e. Bloqueio de reações inespecíficas: incubação durante 20 minutos em câmara úmida à temperatura ambiente, com soro normal de suíno (DAKO, diluição 1:60). A seguir, retirou-se o excesso de soro normal, sem lavagem posterior.

f. Digestão enzimática com pepsina: (exposição de antígenos) banho em solução de HCl 1N (1ml, com 99 ml de água destilada), contendo 0,04% de pepsina por 30 minutos, incubada a 37 graus celsius; lavagem em água corrente e água destilada. Incubação em tampão PBS.

g. Reação antígeno-anticorpo primário: incubação com o anticorpo primário col.IV (DAKO; código M785) diluição 1:100, em BSA (soro albumina bovina). Incubação “overnight” a 4 graus celsius em câmara úmida. Na manhã seguinte, foi retirado o excesso do anticorpo primário e foram feitas três lavagens em PBS de cinco minutos cada, à temperatura ambiente.

h. Reação com o anticorpo secundário biotinilado: dirigido contra o anticorpo primário. Incubação com anticorpo secundário (anti-imunoglobulinas de camundongo, coelho e cabra, produzidos em porco, Kit Multilink DAKO, código E453), diluição 1:200 em tampão Tris (Tris [hydroxymethyl]aminomethane, C₄ H₁₁ N O₃). (Utilizou-se a diluição de 1:10 da solução de 60,5 g de Tris com 89 g de Na Cl, diluídos em 1000 ml de água destilada), durante 30 minutos em câmara úmida, à temperatura ambiente. Foi retirado o excesso do anticorpo secundário biotinilado; a seguir, três lavagens em PBS, cinco minutos cada, à temperatura ambiente.

i. Reação S-ABC - (complexo estreptavidina-biotina peroxidase): incubação com complexo S-ABC (Kit DAKO, código K377), diluição 1:50 em tampão Tris 0,05M. Incubado por 30 minutos em câmara úmida, à temperatura ambiente; a seguir, lavagem em tampão PBS.

j. Coloração: realizada com DAB (3,3” tetrahidrocloreto de diaminobenzidina, SIGMA, código D5637), cromógeno de cor marrom que se impregna no local onde ocorre a reação:



Preparo do DAB: (com utilização de máscara e luvas, por ser teratogênico) 40 mg de DAB em 100 ml de tampão PBS e 40 microlitros de peróxido de hidrogênio a 30%. As lâminas foram deixadas por cerca de dois a três minutos, à temperatura ambiente, ou até a visualização de coloração levemente acastanhada dos cortes. Lavagem destas em água corrente e passagem em água destilada.

k. Contra-coloração: realizada com hematoxilina de Mayer, durante um minuto, à temperatura ambiente. Em seguida, lavagem em água corrente (junto com algumas gotas de amoníaco nesta, para melhor evidenciar a contra-coloração e obtenção de melhor contraste). Seguiu-se lavagem em água corrente e passagem em água destilada.

l. Desidratação: três passagens em álcool absoluto, passagem em três xilóis. Em seguida, montagem das lâminas com Entellan(MERCK, # 7961) (Bálsamo do Canadá).

IDADE	SEXO	TIPO_PELE	PADRAO	TUMOR	E_TOT_A	E_TOT_B
69	1	1	1	0	0,144	0,068
69	0	2	2	0	0,118	0,086
71	0	3	2	0	0,128	0,092
61	1	2	1	0	0,150	0,056
69	0	3	2	0	0,126	0,144
69	0	3	2	0	0,097	0,074
62	1	3	1	0	0,106	0,078
67	1	1	2	0	0,096	0,071
76	0	2	1	0	0,175	0,092
73	0	1	1	0	0,126	0,094
62	1	1	1	1	0,077	0,071
58	1	3	2	0	0,154	0,100
74	0	2	2	0	0,176	0,082
51	1	2	2	0	0,128	0,099
70	0	1	1	1	0,135	0,080
77	0	2	1	1	0,114	0,094
52	0	2	1	0	0,078	0,116
66	0	2	2	1	0,098	0,105
81	0	2	2	1	0,093	0,071
61	1	3	2	1	0,099	0,074
65	0	3	2	1	0,170	0,079
82	0	2	2	1	0,093	0,121
50	0	1	1	1	0,138	0,102
50	0	2	1	1	0,123	0,107
77	0	2	1	1	0,122	0,095
75	1	1	1	1	0,112	0,088
64	1	2	2	0	0,097	0,082
68	0	1	2	1	0,107	0,069
69	0	3	2	0	0,064	0,104
61	1	2	2	1	0,124	0,061
75	0	1	1	1	0,097	0,073
80	0	2	1	1	0,095	0,075
78	0	1	1	1	0,128	0,068
46	0	1	2	1	0,103	0,085
53	1	3	2	1	0,196	0,106
67	0	1	1	1	0,102	0,100
68	0	2	2	0	0,129	0,100
76	0	2	2	1	0,098	0,088
61	0	2	2	1	0,124	0,096
84	1	2	1	1	0,129	0,109
81	0	2	1	1	0,105	0,111
71	0	1	2	0	0,104	0,081
72	0	2	1	1	0,101	0,059
75	0	3	2	1	0,112	0,065
72	1	2	1	1	0,106	0,086
60	0	1	2	1	0,134	0,104
62	0	3	2	1	0,089	0,078
74	1	3	1	1	0,130	0,124
63	0	3	1	1	0,121	0,083
71	1	1	2	0	0,120	0,079
72	0	2	2	0	0,195	0,064

53	1	3	2	0	0,138	0,108
68	0	2	1	1	0,091	0,082
63	0	1	1	0	0,090	0,104
53	0	2	2	0	0,088	0,100
53	1	3	2	0	0,118	0,083
52	1	2	2	1	0,103	0,074
45	0	1	1	0	0,094	0,084
54	0	2	1	0	0,109	0,103
49	0	1	1	0	0,115	0,098
62	0	2	2	0	0,088	0,068

E_TOT_C	E_CORN_A	E_CORN_B	E_CORN_C	E_ESPIN_A	E_ESPIN_B	E_ESPIN_C
0,085	0,097	0,021	0,024	0,034	0,038	0,053
0,098	0,072	0,043	0,052	0,038	0,034	0,040
0,112	0,088	0,036	0,066	0,031	0,040	0,038
0,104	0,108	0,014	0,044	0,038	0,032	0,050
0,105	0,063	0,070	0,055	0,053	0,065	0,048
0,091	0,047	0,030	0,046	0,036	0,036	0,038
0,095	0,056	0,040	0,052	0,042	0,028	0,035
0,130	0,043	0,028	0,057	0,045	0,034	0,060
0,120	0,128	0,053	0,076	0,042	0,032	0,039
0,107	0,060	0,044	0,056	0,056	0,041	0,044
0,093	0,038	0,023	0,024	0,034	0,042	0,060
0,120	0,105	0,032	0,065	0,038	0,058	0,038
0,126	0,121	0,045	0,076	0,065	0,027	0,046
0,114	0,080	0,058	0,066	0,036	0,030	0,038
0,108	0,091	0,046	0,064	0,036	0,025	0,038
0,109	0,071	0,052	0,055	0,034	0,030	0,042
	0,040	0,060		0,028	0,040	
0,075	0,037	0,052	0,017	0,050	0,053	0,039
0,086	0,058	0,032	0,052	0,030	0,031	0,028
0,077	0,063	0,028	0,030	0,030	0,041	0,038
0,076	0,100	0,043	0,026	0,050	0,029	0,044
0,098	0,056	0,074	0,051	0,028	0,038	0,034
0,104	0,060	0,060	0,050	0,055	0,035	0,042
0,108	0,073	0,061	0,048	0,043	0,035	0,051
0,088	0,072	0,048	0,048	0,038	0,040	0,034
0,091	0,047	0,051	0,047	0,054	0,027	0,031
0,102	0,036	0,030	0,038	0,045	0,040	0,051
0,094	0,039	0,027	0,032	0,058	0,035	0,048
0,084	0,028	0,044	0,038	0,032	0,050	0,035
0,110	0,068	0,018	0,039	0,042	0,035	0,061
0,116	0,046	0,029	0,060	0,040	0,034	0,040
0,077	0,028	0,037	0,043	0,056	0,030	0,026
0,107	0,080	0,040	0,058	0,037	0,022	0,043
0,074	0,039	0,039	0,014	0,050	0,038	0,054
0,115	0,136	0,048	0,048	0,042	0,048	0,053
0,090	0,045	0,062	0,039	0,045	0,031	0,048
0,103	0,078	0,055	0,048	0,041	0,038	0,047
0,105	0,065	0,058	0,064	0,025	0,022	0,030
0,099	0,053	0,056	0,056	0,048	0,031	0,036
0,100	0,075	0,062	0,049	0,046	0,034	0,042
0,138	0,051	0,063	0,088	0,042	0,034	0,044
0,114	0,051	0,026	0,034	0,045	0,045	0,070
0,115	0,048	0,026	0,060	0,043	0,029	0,045
0,070	0,068	0,032	0,031	0,034	0,028	0,031
0,084	0,056	0,042	0,037	0,040	0,036	0,038
0,104	0,068	0,059	0,061	0,055	0,032	0,030
0,102	0,036	0,042	0,042	0,041	0,028	0,058
0,076	0,046	0,029	0,026	0,075	0,090	0,046
0,153	0,040	0,025	0,099	0,071	0,048	0,046
0,094	0,056	0,044	0,052	0,056	0,028	0,035
0,090	0,082	0,029	0,041	0,091	0,028	0,040

0,081	0,076	0,057	0,032	0,048	0,043	0,042
0,088	0,054	0,045	0,047	0,036	0,028	0,030
0,101	0,044	0,059	0,048	0,036	0,038	0,040
0,078	0,034	0,044	0,032	0,046	0,049	0,038
0,085	0,055	0,037	0,027	0,054	0,042	0,050
0,096	0,048	0,040	0,042	0,046	0,026	0,041
0,082	0,036	0,042	0,031	0,043	0,034	0,044
0,105	0,055	0,046	0,052	0,042	0,046	0,043
0,098	0,042	0,044	0,038	0,056	0,044	0,052
0,082	0,041	0,022	0,035	0,038	0,042	0,040

GRAN_#_A	GRAN_#_B	GRAN_#_C	FX_SUB_A	FX_SUB_B	FX_SUB_C	Que mel A
2,6	2,0	2,2	0,011		0,000	27,900
3,2	1,4	1,2	0,017	0,000	0,000	10,080
2,0	1,6	1,8	0,022	0,000	0,003	21,630
2,2	1,8	1,0	0,020	0,000	0,000	12,070
2,2	1,4	1,4	0,009	0,014	0,000	15,000
1,4	1,0	1,0	0,015	0,000	0,000	17,800
2,2	1,0	1,6	0,032	0,000	0,000	9,530
1,6	1,0	1,8	0,016	0,000	0,000	16,170
2,2	1,6	1,8	0,022	0,000	0,000	5,520
2,8	1,8	1,8	0,016	0,000	0,000	7,700
1,8	1,0	1,0	0,018	0,000	0,000	3,280
2,2	1,6	1,0	0,021	0,000	0,000	15,650
2,0	1,0	1,8	0,014	0,000	0,000	9,610
2,0	1,6	1,2	0,000	0,000	0,000	20,810
2,0	1,4	1,6	0,011	0,000	0,000	2,960
1,4	1,2	1,2	0,014	0,000	0,000	7,700
2,0	2,0		0,010	0,000		8,130
2,2	2,2	1,6	0,013	0,000	0,004	11,370
2,0	2,0	1,6	0,012	0,000	0,000	8,450
1,8	1,2	1,2	0,015	0,000	0,000	14,700
3,2	1,4	1,8	0,011	0,000	0,000	1,600
2,6	1,8	2,0	0,026	0,000	0,000	8,940
3,0	2,2	1,8	0,014	0,000	0,000	4,080
2,4	2,0	2,0	0,011	0,053	0,001	7,680
1,6	1,4	1,2	0,008	0,000	0,000	16,090
2,2	1,2	1,2	0,005	0,012	0,020	8,150
2,0	1,8	1,8	0,012	0,011	0,000	22,950
2,6	1,8	1,6	0,010	0,016	0,000	21,060
1,8	2,0	1,2	0,011	0,011	0,014	6,300
2,0	1,6	1,6	0,011	0,000	0,000	19,140
2,8	1,8	1,4	0,011	0,010	0,000	13,460
2,6	1,2	1,0	0,008	0,020	0,000	13,050
2,0	1,4	1,4	0,012	0,000	0,000	12,600
1,6	1,8	1,0	0,008	0,007	0,009	6,960
1,8	2,2	1,8	0,009	0,006	0,000	14,750
1,8	1,0	1,0	0,012	0,008	0,000	4,960
2,0	2,0	1,6	0,010	0,000	0,000	10,300
1,6	1,0	1,0	0,035	0,007	0,000	6,000
2,0	1,8	1,2	0,014	0,001	0,014	10,000
1,4	1,2	1,0	0,014	0,000	0,000	6,820
1,8	1,4	1,4	0,011	0,008	0,000	12,520
1,8	1,6	2,0	0,009	0,002	0,000	15,530
1,8	1,8	2,0	0,012	0,000	0,002	13,150
2,4	1,4	1,4	0,012	0,015	0,000	4,430
1,4	1,0	1,0	0,006	0,003	0,000	12,600
1,6	1,0	1,2	0,040	0,010	0,000	5,000
1,8	1,0	1,4	0,060	0,010	0,017	5,520
2,0	1,0	1,0	0,022	0,024	0,000	7,400
2,2	1,6	1,2	0,012	0,000	0,004	4,600
2,0	1,2	1,0	0,006	0,006	0,000	11,900
2,8	1,8	1,2	0,020	0,000	0,000	0,600

2,8	2,0	1,6	0,008	0,000	0,000	17,580
1,8	1,8	1,4	0,015	0,010	0,008	7,400
2,4	1,6	2,0	0,009	0,000	0,000	13,200
2,2	2,0	1,4	0,004	0,000	0,000	4,000
1,8	1,4	1,2	0,010	0,000	0,000	12,700
1,8	1,2	1,8	0,006	0,000	0,000	15,500
2,0	1,0	1,6	0,010	0,000	0,000	16,800
2,6	2,0	1,6	0,009	0,003	0,000	7,050
2,8	2,0	1,8	0,015	0,000	0,000	0,600
1,8	1,4	1,6	0,014	0,000	0,000	7,570

Que mel B	Que mel C	EL_FIBR A	EL_FIBR B	EL_FIBR C	DERME - A	DERME - B
27,900	27,900	34,600	15,300	5,000	0,35	0,52
10,080	10,080	50,700	15,300	17,100	0,44	0,73
21,630	21,630	55,300	12,600	5,500	0,56	0,72
12,070	12,070	0,000	17,200	21,100		0,75
15,000	15,000	35,800	10,400	19,500	0,45	0,79
17,800	17,800	67,700	15,300	7,400	0,47	0,73
9,530	9,530	79,400	23,300	34,200	0,45	0,39
16,170	16,170	75,900	25,900	22,100	0,33	0,56
5,520	5,520	57,100	30,000	22,700	0,12	0,29
7,700	7,700	36,800	27,400	20,000	0,51	0,30
3,280	3,280	37,900	28,800	18,600	0,37	0,36
15,650	15,650	63,000	3,100	2,500	0,59	0,58
9,610	9,610	27,200	31,500	3,000	0,32	0,47
20,810	20,810	33,600	4,100	0,900	0,95	0,83
2,960	2,960	13,900	14,800	3,100	0,13	0,32
7,700	7,700	74,400	3,800	3,200	0,69	0,48
8,130	8,130	74,100	23,000		0,37	0,55
11,370	11,370	24,300	5,200	0,800	0,43	0,75
8,450	8,450	31,400	4,800	3,900	0,14	0,42
14,700	14,700	32,400	7,700	1,600	0,13	0,17
1,600	1,600	27,500	38,300	23,000	0,25	0,53
8,940	8,940	69,400	19,900	18,100	0,35	0,44
4,080	4,080	82,300	45,200	18,100	0,59	0,30
7,680	7,680	80,100	27,400	19,400	0,48	0,56
16,090	16,090	70,900	20,800	18,100	0,19	0,56
8,150	8,150	42,100	40,600	18,500	0,22	0,38
22,950	22,950	65,700	51,500	48,000	0,56	0,66
21,060	21,060	61,100	75,800	26,500	0,15	0,43
6,300	6,300	41,830	51,100	7,400	0,75	0,28
19,140	19,140	106,900	48,428	18,400	0,50	0,72
13,460	13,460	96,000	10,600	6,200	0,32	0,49
13,050	13,050	2,300	6,000	1,300	0,38	0,27
12,600	12,600	97,300	30,000	3,900	0,25	0,27
6,960	6,960	88,500	8,800	1,500	0,64	0,64
14,750	14,750	116,300	2,750	0,500	0,43	0,44
4,960	4,960	94,800	11,700	0,700	0,30	0,41
10,300	10,300	86,100	11,100	3,300	0,29	0,61
6,000	6,000	70,100	26,400	1,800	0,40	0,40
10,000	10,000	98,200	27,000	2,900	0,46	0,39
6,820	6,820	70,500	25,100	1,300	0,12	0,29
12,520	12,520	96,000	51,800	15,700	0,27	0,49
15,530	15,530	57,600	14,300	8,500	0,12	0,44
13,150	13,150	68,300	13,900	6,200	0,49	0,44
4,430	4,430	49,700	28,100	5,200	0,05	0,19
12,600	12,600	52,800	18,100	1,800	0,26	0,54
5,000	5,000	30,500	21,800	20,300	0,17	0,49
5,520	5,520	61,800	34,400	9,400	0,61	0,53
7,400	7,400	63,500	8,300	5,800	0,29	0,46
4,600	4,600	64,500	16,100	3,800	0,48	0,68
11,900	11,900	58,300	30,200	4,125	0,10	0,59
0,600	0,600	14,600	2,600	2,100	0,30	0,68

17,580	17,580	64,800	1,200	0,200	0,77	0,6
7,400	7,400	98,800	28,000	7,900	0,19	0,38
13,200	13,200	61,900	23,500	1,500	0,73	0,51
4,000	4,000	83,600	3,600	9,100	0,75	0,71
12,700	12,700	65,600	4,400	0,700	0,73	0,73
15,500	15,500	41,900	20,600	1,300	0,52	0,71
16,800	16,800	48,400	17,400	1,000	0,81	0,6
7,050	7,050	30,200	27,900	1,200	0,26	0,66
0,600	0,600	7,000	14,500	1,900	0,31	0,74
7,570	7,570	9,400	20,600	0,000	0,36	0,42

DERME - C	M BAS A	M. BAS - C	Area epi A	Area derm A	Area epi B	Area derm B
0,85	0,16	0,1	0,115	3,2	0,145	4,235
0,9	0,14	0,15	0,125	3,57	0,12	2,085
0,92	0,14	0,1	0,115	5,52	0,13	4,275
0,96					0,125	2,59
0,92	0,1		0,17	3,675	0,14	3,26
0,74	0,1	0,2	0,115	3,22	0,10	3,31
0,8		0,1	0,075	2,52	0,10	3,065
7	0,1	0,24	0,14	1,805	0,11	2,39
0,55	0,14	0,1	0,085	3,835	0,07	1,125
0,73			0,21	3,415	0,145	2,935
0,65	0,15	0,16	0,12	3,97	0,13	3,435
0,86	0,2	0,1	0,175	5,425	0,10	2,08
0,87			0,145	4,53	0,09	5,155
0,89		0,1	0,155	6,025	0,095	5,39
0,71	0,1	0,12	0,115	4,81	0,075	4,43
0,82			0,105	5,96	0,095	2,86
	0,16		0,105	2,495	0,12	3,235
0,79	0,12	0,1	0,155	3,32	0,12	1,67
0,88	0,1	0,1	0,11	2,645	0,08	3,535
0,81		0,14	0,09	1,67	0,10	5,17
0,81			0,165	2,96	0,10	4,08
0,69	0,15	0,13	0,11	5,70	0,10	2,92
0,9	0,22	0,17	0,135	4,31	0,095	5,315
0,81	0,18		0,14	4,355	0,10	2,48
0,91	0,14		0,14	3,77	0,10	3,475
0,88	0,12		0,095	3,155	0,08	3,4
0,85	0,1		0,15	2,89	0,11	2,325
0,88	0,1	0,1	0,135	2,93	0,09	2,375
0,92	0,1	0,15			0,085	1,865
0,9	0,1		0,10	1,725	0,075	1,915
0,92	0,1	0,1	0,085	3,585	0,08	1,64
0,83			0,105	2,96	0,095	
0,84	0,1	0,22	0,10	4,11	0,06	2,25
0,91		0,17	0,185	3,585	0,10	2,965
0,87	0,17	0,21	0,135	2,91	0,10	2,515
0,83			0,105	3,18	0,09	2,585
0,91	0,28	0,11	0,11	4,97	0,125	3,325
0,83	0,19	0,2	0,095	1,74	0,075	3,335
0,91	0,11		0,105	3,285	0,115	2,84
0,78	0,1	0,1	0,10	4,755	0,06	2,44
0,79	0,19		0,12	4,24	0,115	2,465
0,73	0,11	0,1	0,16	4,835	0,155	4,075
0,77	0,18	0,12	0,115	4,22	0,09	3,25
0,82	0,15	0,13	0,11	3,49	0,09	2,27
0,87	0,1	0,16	0,115	4,93	0,095	3,58
0,83			0,115	4,38	0,11	3,665
0,71	0,18	0,15	0,135	4,01	0,085	5,46
0,63			0,145	3,345	0,155	2,77
0,77	0,12	0,18	0,175	4,23	0,15	4,965
0,92	0,15	0,1	0,12	4,295	0,11	4,145
0,89	0,17	0,12	0,20	2,45	0,075	3,785

0,8	0,1	0,17	0,15	2,75	0,125	
0,83	0,11	0,12	0,085		0,13	3,76
0,87	0,1	0,1	0,125	4,335	0,11	4,165
0,9	0,18	0,18	0,135	5,365	0,16	2,81
0,85	0,2	0,2	0,12	4,46	0,13	5,68
0,87	0,19		0,16	3,37	0,085	3,25
0,81	0,1	0,13	0,14	3,18	0,105	3,80
0,81	0,13	0,13	0,12	4,24	0,155	2,85
0,75			0,19	4,70	0,115	5,01
0,88	0,19	0,13	0,095	4,235	0,11	3,89

Area epi C	Area derm C
0,12	2,97
0,095	3,61
0,085	3,61
0,10	4,80
0,11	4,55
0,125	2,465
0,115	3,295
0,19	2,975
0,09	5,79
0,115	2,815
0,175	3,98
0,125	3,795
0,175	1,74
0,065	5,795
0,09	7,365
0,10	5,485
0,115	3,36
0,09	4,11
0,13	7,485
0,105	5,435
0,105	6,59
0,07	4,39
0,17	4,81
0,13	3,945
0,09	5,675
0,125	3,90
0,10	2,705
0,11	3,475
0,11	4,28
0,10	3,69
0,075	4,665
0,105	4,85
0,15	4,38
0,125	3,79
0,12	3,015
0,12	5,955
0,09	5,17
0,10	6,3
0,10	6,705
0,105	5,52
0,165	6,17
0,125	4,895
0,085	5,71
0,10	4,81
0,115	5,255
0,09	8,03
0,14	2,80
0,135	5,655
0,125	4,82
0,125	3,22

0,14	3,54
0,12	4,73
0,145	5,735
0,11	2,83
0,145	6,86
0,12	6,05
0,115	5,70
0,145	4,29
0,12	5,54
0,13	4,27