

**Estudo da expressão imuno-  
histoquímica da metaloproteinase-2  
da matriz e do seu inibidor tecidual no  
melanoma cutâneo e as relações com  
os fatores prognósticos  
histopatológicos**

**UFCSPA**

Nome do autor: Maria  
Carolina Widholzer Rey  
Nome do orientador: Prof Dr.  
Renan Rangel Bonamigo

Universidade Federal de Ciências da Saúde  
de Porto Alegre

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da  
Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre como requisito  
para a obtenção do grau de Mestre

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**Estudo da expressão imuno-  
histoquímica da metaloproteinase-2  
da matriz e do seu inibidor tecidual no  
melanoma cutâneo e as relações com  
os fatores prognósticos  
histopatológicos**

**UFCSPA**

Nome do autor: Maria  
Carolina Widholzer Rey  
Nome do orientador: Prof Dr.  
Renan Rangel Bonamigo

Universidade Federal de Ciências da Saúde  
de Porto Alegre

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da  
Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre como requisito  
para a obtenção do grau de Mestre

R456e Rey, Maria Carolina Widholzer  
Estudo da expressão imuno-histoquímica da metaloproteinase-2 da matriz e do seu inibidor tecidual no melanoma cutâneo e as relações com os fatores prognósticos histopatológicos / por Maria Carolina Widholzer Rey. – 2009.  
123 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) -- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em Patologia, 2009.

“Orientação: Prof. Dr. Renan Rangel Bonamigo”.

1. Melanoma. 2. Metástases. 3. Metaloproteínases da matriz. 4. Gelatinases. 5. Prognóstico histopatológico. I. Título.

CDD 616.994  
CDU 616-006

*Este estudo é dedicado à Disciplina e ao Serviço de Dermatologia da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, assim como aos pacientes atendidos por este Serviço, em especial aqueles acometidos por melanoma.*

**Agradecimento afetuoso à minha família,  
meus avós e meus irmãos,  
Rafael, Gabriel, Gustavo e,  
em especial,  
aos meus pais Maria Elisabeth e Nei**

## AGRADECIMENTOS

Esta pesquisa só pôde ser realizada, pois contou com o trabalho e a dedicação de diversas pessoas. Todas contribuíram para o resultado aqui apresentado. Gostaria de agradecer sinceramente a algumas destas pessoas abaixo citadas:

Ao Professor Doutor **Renan Rangel Bonamigo** por sua orientação, por seus ensinamentos e pelo exemplo de excelência em tudo que exerce.

Aos Professores Dr. **André Cartell** e Dr. **Roque Domingos Furian** pela atenção e pela disponibilidade para a leitura das lâminas deste trabalho.

À Professora Dra. **Maria Isabel Albano Edelweiss** pelos ensinamentos técnicos imprescindíveis para a elaboração do material deste estudo.

Ao Dr. **Rafael Bonfá** e à acadêmica de medicina **Raquel Bonfá** pelo estímulo e pela colaboração para o desenvolvimento deste projeto.

Ao Dr. **Kauê Marcolin Duro** pelo companheirismo, pelo apoio e pelo carinho.

Aos meus professores, figuras indispensáveis na minha formação. Professores **Aida Libis, Airton Stein, Cláudio Bartelle, Érika Geier, Irene Menezes, Luiz Antônio Bernd, Magda Weber, Walmor Bonatto.**

Aos meus colegas dermatologistas e aos residentes e especializandos do Serviço de Dermatologia da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre.

Ao Pró-diretor de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Professor Dr. **Cláudio Osmar Pereira Alexandre** pelo incentivo ao aprimoramento científico.

À técnica do laboratório de Pós-Graduação da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, **Rosalva Tereza Meurer** que, de maneira incansável, superou todas as etapas impostas para a confecção das lâminas de imuno-histoquímica.

Às secretárias do Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, **Ivonicé Oliveira dos Santos e Maristela Pasin** pela atenção e pelo auxílio em todo este processo.

Aos meus amigos **Fabiane Barbosa, Fernanda Luft, Juliane Prietsch, Karen Leipelt e Maurício Pires** pelo carinho.

*Esta pesquisa recebeu auxílio de bolsa de Mestrado da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) para o desenvolvimento do estudo.*



**SUMÁRIO**

|                                                                                                          |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO.....</b>                                                                                | <b>1</b>  |
| <b>2. REVISÃO DA LITERATURA.....</b>                                                                     | <b>5</b>  |
| <b>Melanoma.....</b>                                                                                     | <b>5</b>  |
| <b>Conceitos e epidemiologia atual.....</b>                                                              | <b>5</b>  |
| <b>Fatores de risco.....</b>                                                                             | <b>9</b>  |
| <b>Carcinogênese.....</b>                                                                                | <b>15</b> |
| <b>Aspectos clínicos.....</b>                                                                            | <b>17</b> |
| <b>Histopatologia.....</b>                                                                               | <b>20</b> |
| <b>2.1.5.1 Critérios histopatológicos como fatores<br/>            prognósticos.....</b>                 | <b>21</b> |
| <b>Manejo e prognóstico.....</b>                                                                         | <b>24</b> |
| <b>Metaloproteinases da matriz e inibidores teciduais.....</b>                                           | <b>27</b> |
| <b>Metaloproteinases e neoplasias.....</b>                                                               | <b>32</b> |
| <b>Metaloproteinases e melanoma.....</b>                                                                 | <b>36</b> |
| <b>Novas perspectivas: a interação das MMPs com moléculas de adesão<br/>    celular no melanoma.....</b> | <b>40</b> |
| <b>Métodos para o estudo da MMP-2 e do TIMP-2.....</b>                                                   | <b>41</b> |
| <b>Imuno-histoquímica.....</b>                                                                           | <b>42</b> |
| <b>3. JUSTIFICATIVA.....</b>                                                                             | <b>44</b> |

|                                                                     |            |
|---------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>4. OBJETIVOS.....</b>                                            | <b>46</b>  |
| Objetivo Geral.....                                                 | 46         |
| Objetivos Específicos.....                                          | 46         |
| <br>                                                                |            |
| <b>5. REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO E DA REVISÃO DA LITERATURA...48</b> |            |
| <br>                                                                |            |
| <b>6. ARTIGOS.....</b>                                              | <b>53</b>  |
| Artigo científico redigido em inglês.....                           | 54         |
| Artigo científico redigido em português.....                        | 82         |
| <br>                                                                |            |
| <b>7. ANEXOS.....</b>                                               | <b>111</b> |
| Considerações éticas.....                                           | 111        |
| Termo de compromisso para utilização de dados.....                  | 112        |
| Detalhamento da técnica de imuno-histoquímica.....                  | 113        |
| Instrumento de coleta de dados.....                                 | 115        |
| Fotografias do trabalho.....                                        | 116        |

## LISTA DE FIGURAS (FOTOS)

### ARTIGO REDIGIDO EM INGLÊS

**Figure 1** – Expression of MMP-2 in the superficial spreading type melanoma: stroma 3+ (immunoperoxidase – AEC, 400 x, in the original).....72

**Figure 2** – Expression of TIMP-2 in the superficial spreading type melanoma: epidermal tumor cells 2+ (immunoperoxidase – AEC, 400 x, in the original).....73

**Figure 3** – Expression of MMP-2 in cutaneous metastasis of melanoma: stroma 1+; vessels 3+; dermal tumor cells 3+ (immunoperoxidase – AEC, 50 x, in the original)..... 74

### ARTIGO REDIGIDO EM PORTUGUÊS

**Figura 1** – Expressão da MMP-2 no melanoma tipo espalhamento superficial: estroma 3+ (imunoperoxidase – AEC, 400 x, no original).....100

**Figura 2** – Expressão do TIMP-2 no melanoma tipo espalhamento superficial: células tumorais epidérmicas 2+ (imunoperoxidase – AEC, 400 x, no original)...101

**Figura 3** – Expressão da MMP-2 em metástase cutânea de melanoma: estroma 1+; vasos 3+; células tumorais dérmicas 3+ (imunoperoxidase – AEC, 50 x, no original).....102

**ANEXOS**

- Foto 1** – Expressão da metaloproteinase-2 (MMP-2) no melanoma tipo espalhamento superficial: vasos 2+; células tumorais epidérmicas 2+; células tumorais dérmicas 1+ e queratinócitos 1+ (imunoperoxidase – AEC, 50x, no original).....116
- Foto 2** – Expressão do inibidor tecidual da metaloproteinase-2 (TIMP-2) no melanoma tipo espalhamento superficial: células tumorais epidérmicas 2+ (imunoperoxidase, 400x, no original).....117
- Foto 3** – Expressão da MMP-2 no melanoma tipo espalhamento superficial: estroma 1+ e células tumorais dérmicas 3+ (imunoperoxidase – AEC, 400x, no original).....118
- Foto 4** – Expressão da MMP-2 no melanoma nodular: estroma 3+; vasos 3+; células tumorais epidérmicas 3+; células tumorais dérmicas 3+ e queratinócitos 1+ (imunoperoxidase – AEC, 50x, no original).....119
- Foto 5** – MMP-2: detalhe da expressão no estroma 3+ (imunoperoxidase – AEC, 400x, no original).....120

**Foto 6** – Expressão da MMP-2 em metástase cutânea de melanoma: estroma 1+; vasos 3+ e células tumorais dérmicas 3+ (imunoperoxidase – AEC, 50x, no original).....121

**Foto 7** – Expressão da MMP-2 em metástase cutânea de melanoma: células tumorais dérmicas 3+ (imunoperoxidase – AEC, 400x, no original).....122

**Foto 8** – Expressão do TIMP-2 em metástase cutânea de melanoma: estroma 1+ e ausência de expressão em demais estruturas (imunoperoxidase – AEC, 100x, no original).....123

**LISTA DE TABELAS****ARTIGO REDIGIDO EM INGLÊS**

**Table 1** – General characteristics of the patients and of the melanomas.....66

**Table 2** – Evaluation of the association between MMP-2 expression in cutaneous melanoma and its prognostic factors.....70

**Table 3** – Evaluation of association between TIMP-2 expression in cutaneous melanoma and its prognostic factors.....71

**ARTIGO REDIGIDO EM PORTUGUÊS**

**Tabela 1** – Características gerais dos pacientes e dos melanomas.....94

**Tabela 2** – Avaliação da associação entre a expressão da metaloproteinase-2 (MMP-2) no melanoma cutâneo e seus fatores prognósticos.....98

**Tabela 3** – Avaliação da associação entre a expressão do inibidor tecidual da metaloproteinase-2 (TIMP-2) no melanoma cutâneo e seus fatores prognósticos.....99

**LISTA DE ABREVIATURAS**

ABCD – regra clínica mnemônica correspondendo à assimetria, aos bordos irregulares, às cores variadas e ao diâmetro maior do que 6 milímetros da lesão

AEC – 3-amino-9-etil carbazole

AJCC – do inglês *American Joint Committee on Cancer* - Comissão Americana de Câncer

CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CD44 – glicoproteína transmembrana envolvida na interação célula-célula e célula-matriz

CDKN2A – do inglês *cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*

CDK4 - do inglês *cyclin-dependent kinase 4*

CHSC – Complexo Hospitalar da Santa Casa

CNS – Conselho Nacional de Saúde

cm - centímetros

DAB - diaminobenzidina

DNA (ADN) – ácido desoxirribonucleico

ELISA – do inglês *enzyme-linked immunosorbent assay* - ensaio imunoenzimático

FFFCMPA – Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre

GBM – Grupo Brasileiro de Melanoma

H-E – hematoxilina e eosina

INCA - Instituto Nacional de Câncer

KDa – quilodálton

mm - milímetros

mm<sup>2</sup> – milímetros quadrados

MMPs – metaloproteinases da matriz

MMP-1 - metaloproteinase-1 da matriz

MMP-2 – metaloproteinase-2 da matriz

MMP-9 - metaloproteinase-9 da matriz

MMP-13 - metaloproteinase-13 da matriz

MT1-MMP – metaloproteinase tipo membrana 1

P – significância estatística

pH – escala que mede o grau de acidez de diversas substâncias

RUV – radiação ultravioleta

SIDA/AIDS – síndrome da imunodeficiência adquirida

TIMPs – inibidores teciduais das metaloproteinases

TIMP-1 - inibidor tecidual 1 das metaloproteinases

TIMP-2 – inibidor tecidual 2 das metaloproteinases

TIMP-3 - inibidor tecidual 3 das metaloproteinases

UFCSPA – Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

UFRGS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

UVA - radiação ultravioleta tipo A

UVB - radiação ultravioleta tipo B

16q13 – localização cromossômica

20q11-q13 – localização cromossômica



$\alpha$  - alfa

$\beta$  - beta

$\alpha_v\beta_3$  - integrina

## 1. INTRODUÇÃO

O melanoma é uma neoplasia maligna originada, na maioria das vezes, a partir dos melanócitos localizados na pele. Ocorre principalmente em populações caucasianas (Flórez e Cruces 2004), com nítidas evidências de que indivíduos com o fenótipo claro possuem maior predisposição para o seu desenvolvimento (Azevedo e Mendonça 1992; Flórez e Cruces 2004).

A incidência do melanoma vem crescendo em várias regiões do mundo (Azevedo e Mendonça 1992; Venegas, Flores et al. 1992; Bakos, Wagner et al. 2002; Flórez e Cruces 2004), sendo considerado um grande problema em Saúde Pública (Venegas, Flores et al. 1992; Marks 2000; Thompson, Scolyer et al. 2005; Cummins, Cummins et al. 2006).

A espessura tumoral, medida vertical do tumor (denominada de Índice de Breslow), é um parâmetro essencial na determinação do prognóstico dos pacientes (Flórez e Cruces 2004). O Grupo Multicêntrico e Multidisciplinar Brasileiro para Estudo do Melanoma (GBM), em consenso de 2003, recomendou que o laudo anatomopatológico do melanoma contivesse, além da espessura tumoral, os seguintes parâmetros, os quais também serviriam como fatores prognósticos (de acordo com dados da literatura): tipo histológico, ulceração, fase de crescimento (radial ou vertical), nível de Clark, índice mitótico, infiltrado inflamatório linfocitário peritumoral, infiltrado inflamatório

intratumoral, invasão vascular linfática e sanguínea<sup>1</sup>, invasão perineural, regressão, satelitose microscópica e margens cirúrgicas (Landman et al 2003).

Mediadores biológicos têm sido reconhecidos na investigação sobre os caminhos patogênicos desta neoplasia.

As metaloproteinases (MMPs) são enzimas proteolíticas dependentes de zinco que estão envolvidas em processos fisiológicos e patológicos. As principais ações das MMPs estão relacionadas ao remodelamento dos componentes da matriz extracelular. Participam, também, do processo de migração de células normais, malignas e inflamatórias, bem como do processo de angiogênese (Hofmann, Westphal et al. 2000).

A metaloproteinase da matriz-2 (MMP-2), também denominada de gelatinase A, pertence ao grupo das gelatinases, assim designadas por apresentarem marcante especificidade pelo colágeno desnaturado (conhecido como gelatina) (Seltzer e Eisen 2003). Aumentos na expressão de MMP-2 foram associados com a progressão do melanoma (Hofmann, Westphal et al. 2000).

Todas as metaloproteinases são inibidas por inibidores naturais específicos das mesmas, denominados de inibidores teciduais das metaloproteinases (TIMPs). Existe um sistema de inibição específica da ação das gelatinases, sendo que o inibidor tecidual TIMP-2 atua sobre a MMP-2. O desequilíbrio

---

<sup>1</sup> Esta dissertação segue as novas regras estabelecidas pela Reforma Ortográfica, em vigor desde janeiro de 2009 no Brasil. Entretanto, as possíveis alterações com relação aos vocábulos compostos e derivados, estudadas pela Academia Brasileira de Letras e previstas para março de 2009, ainda não haviam sido divulgadas quando da redação deste trabalho.

entre as secreções da MMP-2 e do TIMP-2 poderia contribuir para o processo patogênico em determinadas situações (Hofmann, Westphal et al. 2000).

Desde o estabelecimento da diretriz sobre o laudo anatomopatológico do melanoma pelo GBM, poucos trabalhos foram publicados utilizando o protocolo oficial, sendo escassos os estudos dessas variáveis na literatura nacional.

Apesar de Redondo e colaboradores terem concluído que a expressão de MMP-2 possa estar associada com a progressão do melanoma, estes autores basearam-se em um estudo com poucos casos (Redondo, Lloret et al. 2005). Não são encontrados estudos que relacionem a expressão da MMP-2 aos fatores prognósticos histopatológicos. Além disso, pouco se encontra sobre a expressão do TIMP-2 no melanoma.

Neste sentido, é provavelmente importante o aprofundamento do conhecimento a respeito dos eventos que regulam o comportamento biológico do melanoma e que envolvem a MMP-2 e o seu inibidor (Flórez e Cruces 2004).

O presente estudo tem como primordial objetivo avaliar a expressão imuno-histoquímica da MMP-2 e do TIMP-2 no melanoma cutâneo primário e estabelecer suas relações com os fatores prognósticos histopatológicos da neoplasia, além de descrever essas expressões nas metástases cutâneas do melanoma.

A análise da forma como se distribui a expressão da MMP-2 e do TIMP-2 nos melanomas cutâneos primários e nas metástases cutâneas dos melanomas poderá auxiliar na compreensão da patogênese e do prognóstico

da neoplasia, além de contribuir para a reflexão sobre estratégias para terapias adjuvantes.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. Melanoma

#### 2.1.1. Conceitos e epidemiologia atual

Os melanócitos são células dendríticas e especializadas, encontradas principalmente na zona da membrana basal da epiderme cutânea, nos olhos (Chu, Haake et al. 2003; Gray-Schopfer, Wellbrock et al. 2007) e no sistema nervoso central. São responsáveis pela produção de um pigmento denominado melanina, a qual confere a cor da pele e dos cabelos (Gray-Schopfer, Wellbrock et al. 2007).

Os melanócitos cutâneos originam-se de precursores a partir da crista neural e migram até a pele durante o desenvolvimento embrionário. Na pele, essas células localizam-se na junção entre a epiderme e a derme e nos folículos pilosos, e sua homeostase é regulada pelos queratinócitos epidérmicos (Gray-Schopfer, Wellbrock et al. 2007). Acredita-se que aproximadamente 36 queratinócitos basais ou suprabasais coexistam funcionalmente com cada melanócito (Chu, Haake et al. 2003).

A célula melanocítica desenvolve uma íntima relação com os queratinócitos, através de seus prolongamentos dendríticos, os quais transferem “pacotes” de

pigmento melânico (melanossomos) aos queratinócitos (Markovic, Erickson et al. 2007).

Em resposta à radiação ultravioleta (RUV), os queratinócitos secretam fatores que regulam a atividade dos melanócitos, estimulando-os à produção de melanina e resultando num aumento da coloração da pele, numa resposta conhecida como bronzeamento cutâneo (Chu, Haake et al. 2003; Gray-Schopfer, Wellbrock et al. 2007). A melanina absorve a RUV e possui uma potente propriedade antioxidante capaz de neutralizar os radicais livres gerados pela RUV (Markovic, Erickson et al. 2007; Passeron, Coelho et al. 2007). Desta maneira, os melanócitos cutâneos apresentam um importante papel na proteção da pele dos efeitos danosos da RUV e na prevenção do câncer cutâneo (Cummins, Cummins et al. 2006; Gray-Schopfer, Wellbrock et al. 2007). Paradoxalmente, os melanócitos são lesados e transformados pela RUV (Markovic, Erickson et al. 2007), sendo, assim, os precursores do melanoma, o tipo mais letal dos cânceres da pele (Cummins, Cummins et al. 2006; Gray-Schopfer, Wellbrock et al. 2007).

O melanoma não é um câncer exclusivamente cutâneo, embora 95% dos casos ocorram na pele. Os olhos, as mucosas, os tratos gastrintestinal e geniturinário, as leptomeninges e os linfonodos são sítios de melanoma primário extracutâneo (Markovic, Erickson et al. 2007).

O melanoma cutâneo primário é definido como qualquer lesão primária de melanoma, independentemente da espessura tumoral, em paciente sem evidência clínica ou histológica de doença metastática regional ou a distância (Sober, Chuang et al. 2001).

A metástase designa a lesão formada pelo conjunto de células tumorais agrupadas em um foco micro ou macroscopicamente e que não apresenta continuidade com a lesão primária. No melanoma, podem ser metástases satélites (que se situam até 5 cm da lesão primária), metástases em trânsito (situadas mais de 5 cm da lesão primária) ou metástases a distância (Markovic, Erickson et al. 2007).

O câncer da pele é o terceiro câncer mais comum em humanos (Gray-Schopfer, Wellbrock et al. 2007) e a sua incidência global vem aumentando de maneira importante nos últimos anos (Azevedo e Mendonça 1992; Marks 2000; Garbe, Hauschild et al. 2007; Goldberg, Doucette et al. 2007; Gray-Schopfer, Wellbrock et al. 2007; Markovic, Erickson et al. 2007). Neste sentido, o melanoma cutâneo foi identificado como um dos cânceres com maior taxa de crescimento em populações brancas em todo o mundo (Venegas, Flores et al. 1992; Marks 2000; Bakos, Wagner et al. 2002; Flórez e Cruces 2004), havendo evidências de que, como já referido, pessoas de pele clara têm maior predisposição para o desenvolvimento deste tipo de neoplasia (Azevedo e Mendonça 1992).

A taxa anual de aumento na incidência do melanoma varia entre as distintas populações, mas, em geral, oscila entre 3 e 7% em populações caucasianas (Marks 2000; Desmond e Soong 2003). Em vista disso, o melanoma vem se tornando uma preocupação em diversos países (Azevedo e Mendonça 1992; Venegas, Flores et al. 1992; Marks 2000). Afortunadamente, os dados demonstram que a incidência do melanoma aumentou principalmente devido ao aumento do número de casos de melanomas considerados finos, iniciais ou de pequena espessura (Marks 2000; Flórez e Cruces 2004; Garbe e Eigentler 2007).



Acredita-se que a incidência do melanoma no Brasil também esteja aumentando, embora não se possua um registro completo dos casos de câncer no país (Bakos, Wagner et al. 2002), devido à subnotificação.

Sabe-se que os indivíduos de origem europeia, que vivem em climas tropicais ou temperados, apresentam um risco elevado de desenvolver câncer cutâneo. É possível encontrar, nas regiões sudeste e sul do Brasil, comunidades de imigrantes europeus ou de seus descendentes de pele clara que se estabeleceram e se dedicaram à atividade laboral com grande exposição à RUV (trabalho rural). Além disso, a exposição solar intermitente e intensa decorrente de atividades de lazer na época do verão é bastante comum em todo o território brasileiro (Azevedo e Mendonça 1992; Venegas, Flores et al. 1992; Bakos, Wagner et al. 2002). Sendo assim, Azevedo e colaboradores concluíram que existem riscos potenciais para o desenvolvimento do câncer da pele na população brasileira, em especial nos indivíduos das regiões sul e sudeste (Azevedo e Mendonça 1992).

Segundo dados do Instituto Nacional de Câncer (INCA) do Ministério da Saúde do Brasil, estavam previstos, para 2008, 2.950 casos novos de melanoma em homens e 2.970 casos novos em mulheres. As maiores taxas estimadas em homens e mulheres encontravam-se nas regiões sudeste e sul (2009).

Embora represente apenas 4% das neoplasias malignas cutâneas, o melanoma é responsável por aproximadamente 80% das mortes por câncer da pele (Venegas, Flores et al. 1992; Miller e Mihm Jr 2006), apresentando, assim, alta morbimortalidade (Venegas, Flores et al. 1992).

A distribuição desta neoplasia entre os sexos varia de acordo com as taxas de incidência de melanoma nas distintas populações (Marks 2000). Em um estudo realizado em um hospital de nível terciário em Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Venegas e colaboradores relataram um maior número de casos em homens. A faixa etária mais atingida nestes pacientes foi entre 35 e 55 anos de idade, tendo sido encontrado com maior frequência em áreas de cabeça e tronco nos indivíduos do sexo masculino e nos membros inferiores nas pacientes do sexo feminino (Venegas, Flores et al. 1992).

### **2.1.2. Fatores de risco**

Ainda que sua etiologia não seja completamente entendida, vários fatores estão relacionados ao surgimento do melanoma (Venegas, Flores et al. 1992). A probabilidade de desenvolvimento deste câncer em cada indivíduo é o resultado da combinação entre fatores predisponentes constitucionais (ou hereditários) e a exposição a fatores ambientais, os quais produzirão o desenvolvimento tumoral em indivíduos suscetíveis (Marks 2000).

O principal fator de risco constitucional para o surgimento do melanoma é a cor da pele do indivíduo. Sabe-se que indivíduos de pele clara (fototipos I e II de acordo com a classificação de Fitzpatrick) apresentam maior risco de desenvolvimento da neoplasia (Marks 2000). O risco igualmente é elevado em pessoas com olhos claros, particularmente, de cor azul e com cabelos loiros e, principalmente, ruivos (Thompson, Scolyer et al. 2005; Markovic, Erickson et al. 2007).

São também considerados fatores de risco constitucionais a presença de um grande número de nevos melanocíticos (principalmente mais de 100 nevos) (Thompson, Scolyer et al. 2005; Cummins, Cummins et al. 2006; Miller e Mihm Jr 2006), a presença de nevos atípicos e a presença de nevo melanocítico congênito gigante (maior do que 20 cm) (Cummins, Cummins et al. 2006; Markovic, Erickson et al. 2007).

Além destes, são fatores de risco a tendência ao desenvolvimento de efélides, a história pessoal ou familiar de melanoma e a idade avançada (Marks 2000; Cummins, Cummins et al. 2006).

A história familiar de melanoma é considerada um importante fator de risco para o desenvolvimento desta neoplasia. Os pacientes que possuem um familiar de primeiro grau com melanoma apresentam aproximadamente um risco duas vezes maior de desenvolvimento do melanoma em relação aos pacientes que não têm familiares com esta neoplasia (Markovic, Erickson et al. 2007).

Doenças como xeroderma pigmentoso, nas quais existe uma capacidade diminuída de reparo do DNA após a ocorrência de dano desencadeado pela exposição à RUV, também aumentam o risco para o desenvolvimento do melanoma (Marks 2000; Cummins, Cummins et al. 2006; Markovic, Erickson et al. 2007).

Eventualmente, o melanoma ocorre pela presença de mutações herdadas em genes de alta penetrância (Thompson, Scolyer et al. 2005), demonstrando um padrão de herança autossômica dominante (Markovic, Erickson et al. 2007). Estima-se que menos de 2% dos casos de melanoma sejam atribuídos a essas mutações. São genes reconhecidamente relacionados ao melanoma: CDKN2A (do

inglês *cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*) e, menos frequentemente, CDK4 (do inglês *cyclin-dependent kinase 4*) (Thompson, Scolyer et al. 2005; Miller e Mihm Jr 2006; Markovic, Erickson et al. 2007).

A variação em determinados genes (polimorfismo) determina o efeito que cada indivíduo sofre ao se expor à RUV, afetando tanto os mecanismos de defesa da pele em resposta à RUV, quanto o risco individual para o desenvolvimento do melanoma (Miller e Mihm Jr 2006).

Algumas características nos pacientes com melanoma indicam uma predisposição genética. Estas incluem a ocorrência do melanoma em pacientes jovens (antes dos 40 anos de idade), melanomas primários múltiplos, e história de lesões precursoras, como os nevos displásicos. Os pacientes com predisposição genética para o desenvolvimento do melanoma costumam apresentar neoplasias com uma menor espessura e, assim, com um melhor prognóstico (Markovic, Erickson et al. 2007).

Diversos estudos epidemiológicos já demonstraram que a exposição à RUV é o principal fator de risco ambiental para o desenvolvimento do melanoma em indivíduos constitucionalmente predispostos (Marks 2000; Thompson, Scolyer et al. 2005; Markovic, Erickson et al. 2007). Uma história de exposição a grandes quantidades de RUV, suficientes para causar queimaduras solares, tanto na infância, quanto na vida adulta, é considerada relevante no desenvolvimento da neoplasia (Marks 2000; Thompson, Scolyer et al. 2005).

Desta forma, o risco para o desenvolvimento do melanoma é duplicado para indivíduos com história de queimaduras solares, quando comparados aos indivíduos sem história de queimaduras solares. Em recente estudo de meta-

análise, foi demonstrado que as queimaduras solares ocorridas durante todo o período de vida dos indivíduos estão associadas com aumento de risco para o desenvolvimento do melanoma, e não só as que ocorrem na infância (Dennis, Vanbeek et al. 2008).

A presença de lesões de ceratoses actínicas e de câncer da pele não-melanoma (carcinoma basocelular e carcinoma epidermoide) são consideradas como fator de risco para melanoma, devido à exposição solar de que necessitam para a sua indução (Marks 2000; Thompson, Scolyer et al. 2005).

A importância da exposição solar intermitente e/ou cumulativa no desenvolvimento do melanoma refere-se principalmente ao subtipo do melanoma denominado de espalhamento superficial. Em relação ao subtipo designado como lentigo maligno (Melanose de Hutchinson ou Dubreuilh), existe uma nítida relação entre uma exposição solar intensa, por um período prolongado, com o surgimento da neoplasia (Marks 2000).

O risco para o desenvolvimento de melanoma está associado, em especial, a episódios intermitentes de intensa exposição solar, principalmente os que resultam em queimaduras cutâneas, como os que ocorrem em exposições recreacionais nos meses do verão (Cummins, Cummins et al. 2006; Markovic, Erickson et al. 2007). O risco para o desenvolvimento do melanoma também aumenta com a aproximação da linha do Equador. A intensidade da radiação UVB (ultravioleta do tipo B) aumenta consideravelmente entre 10 e 15 horas (Markovic, Erickson et al. 2007).

Acredita-se que a RUV seja a principal faixa para o risco do desenvolvimento do melanoma dentro do espectro da luz solar; entretanto, ainda

não existem estudos em humanos que comprovem este dado (Marks 2000). Inicialmente, acreditava-se que o tipo de RUV que induzia às neoplasias cutâneas era exclusivamente a radiação UVB. Entretanto, tornou-se claro que a exposição à radiação UVA (ultravioleta do tipo A) pode contribuir para o desenvolvimento do melanoma (Cummins, Cummins et al. 2006).

A maior concentração global de radiação UVA ocorre no hemisfério sul, nas latitudes entre 20° e 40°, principalmente durante os meses da estação do verão. A maior dose diária de radiação UVA ocorre na latitude de 30° sul. Esta é a latitude exata da localização da cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil, local onde vivem muitas pessoas de pele clara e de descendência europeia (Bakos, Wagner et al. 2002).

Bakos e colaboradores identificaram os seguintes fatores de risco para o desenvolvimento do melanoma no sul do Brasil: pele clara (fototipos cutâneos I e II de Fitzpatrick), olhos e cabelos claros, presença de nevos atípicos (principalmente se presentes 30 ou mais nevos clinicamente atípicos), efélides e, em especial, a falta da utilização de filtros de proteção solar e a presença de história de queimaduras solares, sendo este último, aparentemente, o fator de risco mais importante para o desenvolvimento da neoplasia nesta população (Bakos, Wagner et al. 2002).

Além disso, reconhecidamente a presença de imunossupressão em indivíduos transplantados tratados com medicações imunossupressoras ou em indivíduos portadores da síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA/AIDS) é

considerada um fator de risco para o desenvolvimento do melanoma (Thompson, Scolyer et al. 2005; Miller e Mihm Jr 2006; Markovic, Erickson et al. 2007).

Outros fatores de risco ambientais para o desenvolvimento do melanoma são estudados, incluindo componentes da dieta, álcool, cafeína, o hábito do tabagismo, fontes de luz fluorescentes, terapia hormonal, gestação, estresse e traumas de repetição; porém, nenhum desses se mostrou epidemiologicamente associado com um aumento de risco para melanoma (Marks 2000; Markovic, Erickson et al. 2007). Os pesticidas domésticos foram identificados como possíveis fatores de risco independentes para o melanoma (Fortes, Mastroeni et al. 2007).

Os dados referentes ao uso de fotoprotetores tópicos são contraditórios, igualmente com carência de evidência epidemiológica que sustente um aumento de risco e/ou proteção com o uso dos fotoprotetores (Marks 2000; Markovic, Erickson et al. 2007).

O uso adequado de fotoprotetores com alto espectro de proteção solar (fator de proteção 30 ou maior) demonstrou reduzir de 30% a 40% o número de nevos melanocíticos adquiridos que se desenvolvem em crianças. Como nevos melanocíticos adquiridos são considerados marcadores de exposição solar e como a exposição solar é considerada um fator de risco para o desenvolvimento do melanoma, os fotoprotetores devem apresentar alguma função na prevenção da neoplasia. Por outro lado, como os fotoprotetores protegem contra queimaduras solares, o seu uso resulta em um aumento do tempo de exposição intencional (recreacional) ao sol, aumentando a exposição total à RUV. O uso exclusivo de fotoprotetores para a proteção ao sol não é o ideal. Outros métodos

como roupas, chapéus e óculos apropriados devem ser utilizados conjuntamente (Markovic, Erickson et al. 2007).

As câmeras de bronzeamento artificial foram modificadas no início da década de 80 e, atualmente, emitem somente radiação UVA (Cummins, Cummins et al. 2006). Dados recentes sugerem que câmeras de bronzeamento podem aumentar o risco do desenvolvimento do melanoma, em especial, com exposições de longa duração e com uma idade precoce de início de sua utilização (Markovic, Erickson et al. 2007).

### **2.1.3. Carcinogênese**

O melanoma desenvolve-se como resultado do acúmulo de anormalidades genéticas ocorridas nos melanócitos que, por sua vez, promovem a proliferação celular e evitam a apoptose que deveria ocorrer em resposta ao dano do DNA (Thompson, Scolyer et al. 2005).

O melanoma é uma doença complexa. O conjunto formado por mutações em genes reguladores do crescimento, juntamente com a produção de fatores de crescimento autócrinos e a perda de receptores de adesão contribuem para a ocorrência de uma sinalização intracelular alterada nos melanócitos, permitindo que os mesmos escapem do rigoroso controle dos queratinócitos. Consequentemente, os melanócitos podem proliferar-se, formando lesões conhecidas como nevos melanocíticos (Gray-Schopfer, Wellbrock et al. 2007). Por outro lado, sabe-se que o melanoma pode originar-se a partir de nevos



melanocíticos ou ocorrer independentemente da existência de um nevo prévio (Marks 2000).

Estudos histológicos sugerem a coexistência de um nevo melanocítico pré-existente, a partir do qual o melanoma poderia desenvolver-se em 30% dos casos. Portanto, a maioria dos casos de melanoma provavelmente desenvolve-se a partir de uma pele previamente normal, num processo denominado “*de novo*” (Marks 2000; Cummins, Cummins et al. 2006).

Os melanomas que se desenvolvem a partir de nevos melanocíticos pré-existentes usualmente são localizados no tronco. Ocorrem em pacientes mais jovens e correspondem a melanomas do subtipo histológico espalhamento superficial (Markovic, Erickson et al. 2007).

As capacidades de invasão local e de produção de metástases são responsáveis pela morbidade e pela mortalidade do melanoma (Miller e MihmJr 2006).

A capacidade de invasão aparece na fase de crescimento vertical da neoplasia, quando as células do melanoma não só penetram na membrana basal, como também crescem dentro da derme como um nódulo em expansão (Miller e MihmJr 2006).

O melanoma metastático desenvolve-se quando as células tumorais dissociam-se da lesão primária, migram através do estroma circundante e invadem os vasos sanguíneos e linfáticos para formar um tumor em um sítio distante da lesão primária (Miller e MihmJr 2006).

A invasão e a disseminação do melanoma estão relacionadas à alteração da adesão intercelular. Normalmente, a adesão intercelular controla a migração

celular, a organização tecidual e a organogênese. Entretanto, distúrbios na adesão celular contribuem para a invasão tumoral, a interação tumor-estroma e a sinalização tumor-células. As caderinas (proteínas transmembrana) sustentam o contato célula-a-célula. As integrinas mediam o contato celular com fibronectina, colágeno e laminina, componentes da matriz extracelular. A transição entre as fases de crescimento radial e vertical do melanoma está associada à expressão de  $\alpha_v\beta_3$  integrina. Esta integrina induz à expressão da metaloproteinase-2 da matriz (MMP-2), a qual degrada o colágeno da membrana basal da epiderme (Miller e MihmJr 2006).

#### **2.1.4. Aspectos clínicos**

O melanoma pode ocorrer em qualquer tecido que contenha melanócitos, incluindo tecidos não-cutâneos. Felizmente, no entanto, a maior parte dos casos de melanomas ocorre na superfície da pele, facilitando, desta maneira, seu diagnóstico precoce (Cummins, Cummins et al. 2006).

A maioria dos melanomas pode ser identificada clinicamente por um exame físico cuidadoso. Usualmente, algumas características estão presentes e são agrupadas em uma regra clínica mnemônica conhecida por ABCD, a qual corresponde à assimetria da lesão, às bordas irregulares, às cores variadas e ao diâmetro maior do que 6 mm. Deve-se suspeitar clinicamente, também, das lesões melanocíticas que apresentam alguma mudança significativa em seu aspecto prévio (crescimento, alteração da cor, prurido, dor, sangramento, ulceração da lesão) (Thompson, Scolyer et al. 2005; Cummins, Cummins et al. 2006; Markovic,

Erickson et al. 2007). Além disso, atualmente, os dermatologistas utilizam o exame adicional com o auxílio do dermatoscópio (instrumento portátil de microscopia de superfície), o que aumenta a acurácia do diagnóstico da lesão (Thompson, Scolyer et al. 2005; Markovic, Erickson et al. 2007).

Clinicamente, são reconhecidos, principalmente, quatro tipos de melanoma: melanoma tipo espalhamento superficial, melanoma nodular, melanoma lentiginoso-acral e melanoma lentigo maligno.

O melanoma tipo espalhamento superficial (ou melanoma extensivo superficial) corresponde a 70% dos casos de melanoma (Cummins, Cummins et al. 2006; Markovic, Erickson et al. 2007). Apresenta uma fase de crescimento radial ou horizontal, durante a qual a lesão permanece exclusivamente restrita à epiderme, aumentando em diâmetro. Esta fase precede a fase de crescimento vertical, na qual a lesão se estende à derme, exibindo potencial metastático elevado. Este tipo de melanoma afeta igualmente homens e mulheres, ocorrendo, mais frequentemente, no tronco, em homens, e nas extremidades inferiores, em mulheres (Cummins, Cummins et al. 2006). É mais comumente diagnosticado entre a quarta e a quinta décadas de vida, em áreas de pele fotoexposta (Markovic, Erickson et al. 2007) e é o subtipo que, com maior frequência, desenvolve-se a partir de um nevo melanocítico pré-existente (Cummins, Cummins et al. 2006).

O melanoma nodular corresponde de 15 a 30% dos casos de melanoma e representa o tipo mais agressivo da neoplasia. Afeta predominantemente homens na quinta década de vida (Cummins, Cummins et al. 2006). Ocorre geralmente no tronco e nos membros dos pacientes (Markovic, Erickson et al. 2007),

habitualmente desenvolve-se “*de novo*” e possui rápido crescimento. O melanoma nodular não possui uma fase de crescimento radial significativa, podendo ser diagnosticado, assim, com um diâmetro pequeno. Como apresenta predominantemente a fase de crescimento vertical, observa-se uma tendência a ser diagnosticado com uma espessura tumoral elevada, o que lhe confere um prognóstico pior, se comparado aos outros subtipos de melanoma. Frequentemente, é mais difícil de ser reconhecido, pois apresenta poucos critérios da regra do ABCD (Cummins, Cummins et al. 2006). Usualmente, são lesões ulceradas e, quando amelanóticas (sem melanina), podem ser confundidas com lesões de origem vascular (Markovic, Erickson et al. 2007).

O melanoma lentiginoso-acral, embora corresponda a menos de 5% do número total de melanomas diagnosticados, é responsável por 35 a 65% dos casos em indivíduos de pele escura (afro-americanos, asiáticos e hispânicos). Ocorre na região palmar, plantar e no leito ungueal. A região plantar corresponde ao local mais comum de sua ocorrência (Cummins, Cummins et al. 2006; Markovic, Erickson et al. 2007). Tipicamente é diagnosticado em estádios relativamente avançados em relação aos outros subtipos de melanoma (Halpern, Marghoob et al. 2003).

O melanoma lentigo maligno ocorre em áreas de pele com grande dano solar, sendo o menos agressivo e correspondendo a menos de 5% dos casos. Usualmente afeta mulheres na sétima década de vida, em áreas de dano solar como face, pescoço e dorso das mãos (Cummins, Cummins et al. 2006). Essa lesão pode desenvolver-se durante várias décadas antes de evoluir para uma neoplasia invasora (Markovic, Erickson et al. 2007).

Outros subtipos de melanoma são raros e podem ser confundidos com outras neoplasias epiteliais ou mesenquimais. Incluem o melanoma desmoplásico, o com células em balão, o mixoide, o com células em anel de sinete, o osteogênico e o rabdoide (Markovic, Erickson et al. 2007).

O curso da progressão de uma lesão com comprometimento exclusivamente cutâneo (melanoma cutâneo primário) até uma lesão de melanoma metastático varia conforme o tipo do melanoma. O melanoma nodular, que apresenta predominantemente uma fase de crescimento vertical, possui a maior tendência para metastatizar precocemente. Os tipos de melanoma com evolução mais indolente permanecem por até 15 anos sem disseminação a distância (Cummins, Cummins et al. 2006).

### **2.1.5. Histopatologia**

Os critérios histopatológicos para o diagnóstico do melanoma são baseados em alterações arquiteturais e citológicas e devem ser interpretadas no contexto clínico da lesão (Markovic, Erickson et al. 2007).

Segundo diretrizes internacionais e do GBM, no exame histopatológico do melanoma devem ser descritos os seguintes parâmetros: espessura tumoral (Índice de Breslow), tipo histológico, ulceração, fase de crescimento (radial ou vertical), nível de Clark, índice mitótico, infiltrado inflamatório linfocitário peritumoral, infiltrado inflamatório intratumoral, invasão vascular linfática e sanguínea, invasão perineural, regressão, satelitose microscópica e margens cirúrgicas (Landman et al 2003).

### **2.1.5.1. Critérios histopatológicos como fatores prognósticos**

#### **Breslow**

Em 1970, o Doutor Alexandre Breslow descreveu uma medida quantitativa da profundidade de invasão das lesões de melanoma. A medida da espessura tumoral em milímetros (mm) é designada com índice de Breslow. Esta medida é feita a partir da parte superior da camada granular da epiderme até a célula tumoral mais profunda. A profundidade de Breslow é o fator prognóstico mais importante nas lesões primárias de melanoma. Melanomas designados como finos são, atualmente, definidos como aqueles com uma espessura tumoral igual ou inferior a 1,0 mm. A espessura de Breslow é uma variável contínua, entretanto, para fins de estadiamento, as lesões são estratificadas em *in situ*, menores ou iguais a 1,0 mm, menores ou iguais a 2,0 mm, menores ou iguais a 4,0 mm ou maiores do que 4,0 mm (Markovic, Erickson et al. 2007).

#### **Ulceração**

A ulceração tumoral é definida como a ausência de uma epiderme intacta sobre a maior parte da lesão de melanoma primário ao exame microscópico. A ulceração é o segundo mais importante fator prognóstico nos pacientes com melanoma (Markovic, Erickson et al. 2007).

#### **Fase de crescimento**

A maioria dos melanomas desenvolve-se seguindo etapas de progressão tumoral. A fase de crescimento radial descreve a etapa inicial do crescimento do melanoma, a qual ocorre dentro da epiderme cutânea e/ou na junção dermo-epidérmica. Todos os melanomas, com exceção dos melanomas nodulares, apresentam uma fase de crescimento radial. Esta fase geralmente não está associada ao desenvolvimento de metástases tumorais. Com a progressão do melanoma, a neoplasia avança para a etapa seguinte de crescimento, designada de fase de crescimento vertical, que é tumorigênica, apresentando atividade mitótica no derma (Markovic, Erickson et al. 2007).

#### Nível de Clark

Os níveis de Clark correspondem à descrição qualitativa dos níveis anatômicos de invasão do melanoma. No nível I de invasão, todas as células tumorais localizam-se na membrana basal da epiderme cutânea (lesão designada como *in situ*). No nível II, o tumor invade o derma papilar. No nível III, o tumor preenche e expande o derma papilar. No nível IV, o tumor invade o derma reticular. Finalmente, no nível V, o tumor invade o tecido adiposo subcutâneo. O nível de invasão é um fator prognóstico significativo em melanomas finos (melanomas que apresentam espessura tumoral igual ou menor a 1,0 mm) (Markovic, Erickson et al. 2007).

#### Índice mitótico

O índice mitótico é calculado a partir do número de mitoses por milímetro quadrado presentes na parte dérmica do tumor (região na qual a maioria das

mitoses é identificada). O índice mitótico é reconhecido como um importante fator prognóstico do melanoma. A ausência de mitoses por milímetro quadrado é associada a um melhor prognóstico do paciente, quando comparada a casos em que se observa 1 mitose por  $\text{mm}^2$ ; entretanto, não se observam diferenças significativas de sobrevida, quando comparadas as presenças de 1 com 2 mitoses por  $\text{mm}^2$ , assim como na comparação de 2 com 3, 3 com 4 e 4 com 5 mitoses por  $\text{mm}^2$  (Markovic, Erickson et al. 2007).

### Regressão

Histologicamente, a regressão tumoral é caracterizada pela ausência de células de melanoma na epiderme e na derme, cercada por um ou pelos dois lados por lesão de melanoma. A derme, nesta área, apresenta tênue fibroplasia, linfócitos dispersos e melanófagos. A presença de regressão completa é incomum. A regressão está associada a um pior prognóstico dos pacientes com melanoma, em especial, aqueles que apresentam regressão extensa (maior do que 75%) ou completa. Acredita-se que a regressão seja particularmente importante nos casos de melanomas finos (Markovic, Erickson et al. 2007).

Os outros critérios prognósticos histopatológicos são os seguintes: infiltrado inflamatório linfocitário peritumoral, infiltrado inflamatório intratumoral (apresenta valor prognóstico; é definido como ausente, leve, moderado ou intenso), invasão vascular linfática e sanguínea, invasão perineural, satelitose microscópica (conjunto de células tumorais agrupadas em um foco microscópico distante até 5



cm da lesão primária e que não apresentam continuidade com esta) (Markovic, Erickson et al. 2007).

### **2.1.6. Manejo e prognóstico**

O estadiamento do melanoma foi atualizado, validado e oficializado pela Comissão Americana de Câncer (*American Joint Committee on Cancer - AJCC*) em 2002. O estadiamento da AJCC divide o melanoma em quatro (4) estádios. Os estádios I e II correspondem aos melanomas com doença localizada, o estádio III corresponde aos melanomas com metástases regionais, e o estádio IV, aos melanomas com metástases a distância (Balch, Buzaid et al. 2001; Markovic, Erickson et al. 2007).

Se o melanoma é diagnosticado precocemente, pode ser curado com a excisão cirúrgica (Azevedo e Mendonça 1992; Venegas, Flores et al. 1992; Roberts, Anstey et al. 2002; Thompson, Scolyer et al. 2005; Cummins, Cummins et al. 2006; Gray-Schopfer, Wellbrock et al. 2007). A cirurgia é a intervenção terapêutica mais efetiva no manejo dos pacientes com melanoma. A maioria dos pacientes com melanoma primário com menos de um milímetro de espessura apresenta um baixo risco de disseminação locorregional ou sistêmica (Markovic, Erickson et al. 2007).

Nos pacientes com melanoma, o comprometimento dos linfonodos pela neoplasia é um poderoso preditor de recorrência da doença e de sobrevida dos pacientes. O risco de envolvimento tumoral dos linfonodos correlaciona-se com a espessura da lesão primária e com a presença, ou não, de ulceração.

Teoricamente, os melanomas apresentam um padrão de metástases que inicialmente envolve os linfonodos regionais. Em virtude desse conceito, desenvolveu-se a prática da dissecação eletiva dos linfonodos (através da técnica da pesquisa do linfonodo sentinela – primeiro linfonodo na drenagem tumoral) em todos os pacientes que apresentam melanomas com alto risco de disseminação regional (maiores do que 1,0 mm de espessura). Embora a dissecação eletiva dos linfonodos não tenha demonstrado alterar a sobrevida dos pacientes, a informação sobre o comprometimento, ou não, dos linfonodos modifica o prognóstico dos pacientes e contribui na decisão de utilização de terapia adjuvante (Markovic, Erickson et al. 2007).

Melanomas metastáticos são altamente refratários às terapias disponíveis atualmente, apresentando um prognóstico ruim e uma alta letalidade (Azevedo e Mendonça 1992; Venegas, Flores et al. 1992; Gray-Schopfer, Wellbrock et al. 2007).

A espessura tumoral e a presença, ou não, de ulceração da lesão foram avaliadas como os mais importantes preditores de sobrevida dos pacientes pela classificação de 2002 da Comissão Americana de Câncer (*American Joint Committee on Cancer - AJCC*) (Markovic, Erickson et al. 2007).

Em 1992, Venegas e colaboradores demonstraram um diagnóstico tardio do melanoma no estado do Rio Grande do Sul, região Sul do Brasil, com 44,6% dos casos sendo diagnosticados com uma espessura tumoral (Índice de Breslow) maior do que 1,51 milímetros (mm) e 23,8% com uma profundidade maior do que 4 mm, demonstrando, à época, uma situação preocupante do diagnóstico do melanoma no Rio Grande do Sul (Venegas, Flores et al. 1992).

Bonfá e colaboradores, em 2007, também em um estudo realizado em um hospital de nível terciário na cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, evidenciaram que 36,9% dos casos de melanoma são diagnosticados com mais de 1,0 mm de espessura tumoral e que 15,9% se apresentam com uma profundidade maior do que 4,0 mm (Bonfá, Bonamigo et al. 2007).

Mais recentemente, foi publicado estudo demonstrando que a especialidade do médico que atende o indivíduo com melanoma pode prever o prognóstico do paciente (Eide, Weinstock et al. 2009).

Em relação à mortalidade por melanoma, sabe-se que a mesma vem aumentando em todo o mundo. Entretanto, a taxa de aumento da mortalidade é menor do que a taxa de aumento de incidência da neoplasia (Marks 2000; Markovic, Erickson et al. 2007). Isto porque, como visto anteriormente, nas últimas décadas, observou-se um aumento na proporção de melanomas considerados finos e de melhor prognóstico (Marks 2000).

Nas últimas décadas, a sobrevida em 5 anos dos pacientes com melanoma melhorou, sendo, atualmente, maior do que 85%; entretanto, o melanoma causa uma mortalidade desproporcional nos pacientes jovens e de meia-idade (Thompson, Scolyer et al. 2005).

O paciente que já apresentou uma lesão de melanoma possui um risco aumentado para o desenvolvimento de um segundo melanoma primário, necessitando de seguimento dermatológico durante toda a sua vida (Cummins, Cummins et al. 2006). Um segundo melanoma desenvolve-se em 8% dos pacientes com melanoma durante os dois primeiros anos a partir do diagnóstico inicial (Dummer, Hauschild et al. 2008). Os pacientes devem ser orientados para

realizarem o autoexame mensal de suas peles, buscando o diagnóstico precoce de novas lesões (Cummins, Cummins et al. 2006).

O elemento mais importante na redução do risco de desenvolvimento de melanoma é a proteção física à exposição à luz solar. São benéficos o uso de roupas e chapéus que protejam dos raios da RUV, o hábito de evitar o sol nos horários de maior intensidade de radiação (das 10 horas da manhã às 3 horas da tarde) e a prevenção de queimaduras solares. Ainda serão necessários novos estudos até o estabelecimento do efeito protetor dos novos fotoprotetores tópicos com bloqueio das radiações UVA e UVB (fator de proteção 15 ou maior). Entretanto, os *guidelines* atuais de prevenção ao melanoma indicam o seu uso (Thompson, Scolyer et al. 2005; Cummins, Cummins et al. 2006).

## **2.2. Metaloproteinases da matriz e inibidores teciduais**

As metaloproteinases da matriz (MMPs), também designadas de matrixinas, são uma família de enzimas que originalmente foram descritas com uma ação predominante na homeostase da matriz extracelular, através da clivagem de substratos componentes desta matriz (Visse e Nagase 2003; Clark, Swingler et al. 2008).

São enzimas proteolíticas dependentes de zinco (metaloproteinases), envolvidas em processos fisiológicos e patológicos em humanos. Fisiologicamente, participam do desenvolvimento do organismo, da morfogênese e da reparação tecidual (Murphy e Nagase 2008). Em condições fisiológicas, a ação

das MMPs apresenta uma regulação precisa; já a perda de controle sobre esta regulação resulta no desenvolvimento de doenças (Visse e Nagase 2003).

As principais ações das MMPs estão relacionadas ao remodelamento dos componentes da matriz extracelular, por meio da degradação do colágeno, da elastina e da fibronectina. Elas possuem também participação no processo de migração de células normais, neoplásicas e inflamatórias, e participam da neoangiogênese (Clark, Swingler et al. 2008).

Atualmente, sabe-se que, além destas atividades, estas enzimas apresentam muitas outras funções, tais como oposição à angiogênese através da degradação da matriz e através da liberação de inibidores da angiogênese, regulação do crescimento celular, liberação de fatores de crescimento, regulação da apoptose, alteração da motilidade celular, efeito sobre o sistema imune e defesa do hospedeiro e modulação da atividade biológica das quimiocinas (Clark, Swingler et al. 2008).

A primeira atividade de MMP descoberta foi a de uma colagenase presente na cauda de um girino que sofria metamorfose. Atualmente, 24 tipos diferentes de MMPs foram identificados em vertebrados, dos quais 23 são encontrados em humanos (Visse e Nagase 2003; Clark, Swingler et al. 2008).

De acordo com sua especificidade por algum substrato, as metaloproteinases são subdivididas em seis grupos: colagenases, gelatinases, estromalisinas, matrilisinas, MMPs tipo-membrana e outras MMPs (Visse e Nagase 2003).

Recentemente, diversas outras enzimas foram descobertas estando classificadas no grupo das outras MMPs (Clark, Swingler et al. 2008).

Estruturalmente, elas possuem um peptídeo sinalizador, um pró-peptídeo, um domínio catalítico, uma região de dobradiça e, na maioria dos casos, um domínio terminal-C (domínio da hemopexina) (Clark, Swingler et al. 2008). No domínio catalítico, estas enzimas contêm um íon de metal (zinco) (Martin e Matrisian 2007).

O pró-peptídeo contém um resíduo Cis (cisteína), o qual se liga ao sítio ativo do íon de zinco, mantendo a latência da enzima. A região de dobradiça liga-se ao domínio da hemopexina, o qual, acredita-se, esteja envolvido na especificidade do substrato e na ligação dos inibidores. Algumas MMPs apresentam variações nesta estrutura (Clark, Swingler et al. 2008).

As gelatinases A e B são também conhecidas como MMP-2 e MMP-9, respectivamente. Estas MMPs apresentam atividade proteolítica similar, degradam o colágeno desnaturado, conhecido como gelatina, e diversas outras moléculas da matriz extracelular, incluindo os colágenos tipo IV, V e XI, laminina e outros (Murphy e Nagase 2008).

Estruturalmente, além dos componentes já descritos, elas apresentam três repetições do domínio da fibronectina tipo II, o qual se insere no domínio catalítico e é responsável pela especificidade destas enzimas (Murphy e Nagase 2008).

A MMP-2 é codificada no cromossomo 16q13 e possui peso molecular de 71 kDa; já a MMP-9 é codificada no cromossomo 20q11-q13 e apresenta peso molecular de 92 kDa (Seltzer e Eisen 2003; Murphy e Nagase 2008).

A MMP-2 é produzida principalmente a partir de células mesenquimais (fibroblastos), ainda que células epidérmicas, endoteliais, macrófagos e neutrófilos possam produzi-la em pequenas quantidades (Seltzer e Eisen 2003).

A MMP-9 é produzida por células inflamatórias ativadas (leucócitos polimorfonucleares, como neutrófilos, eosinófilos e monócitos/macrófagos) e células epidérmicas (especificamente queratinócitos) (Seltzer e Eisen 2003).

As radiações UVA e UVB são indutoras da secreção e da ação destas duas MMPs (Koivukangas, Kallioinen et al. 1994; Fisher, Wang et al. 1997; Brenneisen, Sies et al. 2002). A radiação UVB demonstrou aumentar a expressão de MMP-2 em queratinócitos (Krengel, Alexander et al. 2002). A irradiação com UVB de nevos melanocíticos leva a um aumento na expressão da MMP-2, possivelmente através de linhagens celulares, incluindo queratinócitos, melanócitos, células endoteliais e fibroblastos; em especial pelos melanócitos epidérmicos (Bakos, Bakos et al. 2007).

As MMPs são sintetizadas como pró-enzimas inativas (zimógenos) (Seltzer e Eisen 2003).

As MMPs podem ser ativadas por proteinases ou *in vitro* por agentes químicos. Estes agentes usualmente promovem a ativação enzimática através de um distúrbio na interação entre a cisteína e o zinco. MMPs já ativadas podem ativar outras MMPs (Visse e Nagase 2003).

A pró-MMP-2 (pró-enzima) não é ativada pelos mecanismos usuais. O principal mecanismo de ativação da pró-MMP-2 ocorre na superfície celular e é mediado pelas MMPs tipo-membrana (MT-MMP). A ativação da pró-MMP-2 é mediada pela MT1-MMP e requer a assistência do inibidor tecidual da metaloproteinase-2 (TIMP-2) (Visse e Nagase 2003).

Foi descrita uma família com quatro inibidores específicos das metaloproteinases conhecidos como inibidores teciduais das metaloproteinases

(TIMPs) (Clark, Swingler et al. 2008), os quais participam do controle da atividade das MMPs (Visse e Nagase 2003). Os TIMPs inibem seletivamente e reversivelmente as MMPs (Chang e Werb 2001).

Os TIMPs (peso molecular entre 21 e 29 kDa) possuem um domínio N-terminal e um domínio C-terminal de 125 e 65 aminoácidos, respectivamente. O domínio N-terminal dobra-se como uma unidade separada e é capaz de inibir as MMPs (Visse e Nagase 2003).

O TIMP-1 inibe a ativação da pró-MMP-9 e o TIMP-2 inibe a ativação da pró-MMP-2 (Hofmann, Westphal et al. 2000). Em circunstâncias especiais, o TIMP pode estar envolvido com a ativação da MMP e não com sua inativação. Em baixas concentrações, o TIMP-2 promove a formação de um complexo entre pró-MMP-2 e MT1-MMP na superfície celular, levando à ativação da MMP-2 (Hofmann, Houben et al. 2005).

Além da regulação das MMPs, os TIMPs apresentam outras funções biológicas. MMP-1 e MMP-2 apresentam atividade potencializadora de eritrócitos e promotora de crescimento celular. O aumento nas expressões de TIMP-1, TIMP-2 e TIMP-3 pode reduzir o crescimento de tumores. O TIMP-2 inibe o crescimento de células endoteliais induzido pelo fator de crescimento de fibroblastos (Visse e Nagase 2003).

O controle sobre a atividade das MMPs e dos TIMPs *in vivo* ocorre em diferentes níveis e envolve fatores como regulação da expressão de genes, ativação de pró-enzimas latentes ou zimógenos (forma inativa) e inibição das enzimas ativas por seus inibidores específicos (Clark, Swingler et al. 2008) e pela  $\alpha$ -2-macroglobulina (Seltzer e Eisen 2003).



Em condições patológicas associadas com atividade desregulada das MMPs, mudanças nos níveis dos TIMPs são consideradas importantes, pois afetam diretamente os níveis das MMPs e suas atividades (Visse e Nagase 2003).

### **2.2.1. Metaloproteinases e neoplasias**

Durante muitos anos, as pesquisas em câncer tiveram como foco de interesse principal as células neoplásicas. Entretanto, já foi reconhecida a importância do microambiente tumoral para o desenvolvimento das neoplasias, sendo que Paget, em 1889, propôs a teoria que chamou de “a semente e o solo” (a semente correspondendo às células tumorais e o solo, ao “microambiente”). Atualmente, o entendimento desta teoria postula que os nódulos tumorais, primário e secundário, constituem um complexo ecossistema que contém componentes celulares e não-celulares (Noël, Jost et al. 2008).

**O componente celular inclui as células tumorais, células endoteliais e linfáticas, células musculares, fibroblastos, adipócitos, células imunes e inflamatórias, entre outras. O componente não-celular inclui vários elementos da matriz extracelular, tanto estruturalmente, quanto as moléculas biologicamente ativas que são armazenadas na matriz, do tipo fatores de crescimento e citocinas (Noël, Jost et al. 2008).**

A progressão da neoplasia com invasão tumoral e formação de metástases é um processo de múltiplas etapas, que envolvem a degradação proteolítica da matriz extracelular, alternância da interação célula-célula e célula-matriz

extracelular e migração das células tumorais através da membrana basal (Konstantinopoulos, Karamouzis et al. 2008).

A primeira associação das MMPs com o câncer descreveu a ação enzimática na degradação da membrana basal, tendo sido associada com a atividade das gelatinases (MMP-2 e MMP-9) (Martin e Matrisian 2007).

No presente, já é estabelecida a importância das MMPs neste processo (Konstantinopoulos, Karamouzis et al. 2008). Inicialmente, acreditava-se que as células tumorais expressavam as MMPs. Atualmente, entretanto, sabe-se que muitas das MMPs presentes no microambiente tumoral são expressas pelas células do estroma do hospedeiro (Martin e Matrisian 2007).

As células neoplásicas, no tumor primário, podem expressar MMP-1, -2, -3, -7, -9, -13, -14, -15, -17, -19, -21, -26 e -28. As células do hospedeiro também secretam MMPs. As células endoteliais expressam MMP-2, -3, -9, -14, -15 e -16. Macrófagos podem liberar MMP-1, -2, -9 e -12; neutrófilos, MMP-8 e -9; mastócitos, MMP-9; fibroblastos, MMP-1, -2, -3, -7, -9, -11, -13 e -14 (Noël, Jost et al. 2008).

A comunicação entre as células do estroma do hospedeiro e as células neoplásicas no microambiente tumoral é crítica para a regulação da expressão das MMPs que contribuem no desenvolvimento do câncer (Martin e Matrisian 2007). A elevação da expressão de várias MMPs acentua o comportamento invasor da neoplasia e a sua habilidade de gerar metástases. Além disso, a degradação proteolítica da matriz extracelular pelas MMPs aumenta a disponibilidade de fatores de crescimento existentes na matriz. Em geral, o aumento da expressão dos TIMPs diminui a capacidade do tumor de gerar

metástases e inibe o crescimento da neoplasia (Konstantinopoulos, Karamouzis et al. 2008).

A atividade das MMPs pode induzir ou aumentar o crescimento e a sobrevivência de lesões tumorais, além de estar envolvida com mecanismos de invasão, angiogênese e metástases destas lesões (Chang e Werb 2001).

Assim, o papel das MMPs na carcinogênese vai além da degradação da matriz extracelular. As MMPs promovem a angiogênese, estimulam o crescimento tumoral, regulam a resposta imune inata e apresentam propriedades antiapoptose (Konstantinopoulos, Karamouzis et al. 2008).

Algumas destas atividades podem ser atribuídas à habilidade das MMPs de degradar a matriz extracelular. Entretanto, a maioria destes efeitos biológicos é mediado primariamente pela atividade proteolítica das MMPs em diversos outros substratos que não a matriz, como as quimiocinas, moléculas de adesão, fatores de crescimento, receptores dos fatores de crescimento, moléculas pró-apoptose e moléculas anti-apoptose (Konstantinopoulos, Karamouzis et al. 2008).

Nem todas as MMPs contribuem para a progressão tumoral. Algumas MMPs estão envolvidas na imunidade inata e na defesa do hospedeiro contra o câncer (Konstantinopoulos, Karamouzis et al. 2008). Em alguns casos, as MMPs apresentam papel de proteção, suprimindo o crescimento tumoral, protegendo contra a invasão e o surgimento de metástases e apresentando atividade antiangiogênica (Martin e Matrisian 2007).

Desta forma, de acordo com Konstantinopoulos e cols, quanto à carcinogênese, as MMPs são divididas em três subgrupos: MMPs que promovem

o câncer, MMPs com efeitos promotores e inibidores do câncer e MMPs que apresentam efeitos anticâncer (Konstantinopoulos, Karamouzis et al. 2008):

- MMPs promotoras do câncer: MMP-1, 2 e 7. Degradam a matriz extracelular, promovem a angiogênese, estimulam o crescimento tumoral, apresentam efeito antiapoptose, promovem reabsorção óssea e ativação de osteoclastos.

- MMPs com efeitos promotores e efeitos inibidores de câncer: MMP-3 e 9. Protegem contra a carcinogênese química, promovem a angiogênese e a malignização celular.

- MMPs com efeitos anticâncer: MMP-8, 12 e 14. Inibem o crescimento tumoral e a angiogênese, estimulam a imunidade inata contra o câncer e inibem as metástases tumorais.

Entre as MMPs que contribuem para a progressão tumoral, encontra-se a MMP-2, a qual tem a habilidade de degradar o colágeno tipo IV, promover a angiogênese e a mitogênese. Existe aumento da expressão da MMP-2 em diversas malignidades humanas (Konstantinopoulos, Karamouzis et al. 2008).

Muitas das MMPs que apresentam ação protetora contra o desenvolvimento tumoral são derivadas das células do hospedeiro e não das células tumorais. Em especial, são derivadas das células do infiltrado inflamatório (Martin e Matrisian 2007).

Várias etapas, desde a síntese, secreção, ativação, até a atividade enzimática das MMPs, são passíveis de intervenções farmacológicas. As intervenções que oferecem maiores benefícios são as direcionadas seletivamente contra as MMPs, que exercem exclusivamente efeitos de promoção tumoral,

poupando as MMPs associadas a efeitos colaterais significativos. Dessa forma, resulta em menor toxicidade, quando comparadas aos inibidores não-seletivos das MMPs que possuem amplo espectro (Konstantinopoulos, Karamouzis et al. 2008).

A inibição das MMPs em amplo espectro apresenta vantagens, mas está associada a consequências problemáticas. Os inibidores farmacológicos das MMPs falharam na pesquisa clínica. Atualmente, pequenas moléculas que apresentem especificidade são o foco das pesquisas (Fingleton 2008).

As MMPs atuam em múltiplos estágios durante a progressão dos tumores em geral, agindo, também, nos cânceres da pele.

Os cânceres da pele são, usualmente, divididos em cânceres não-melanoma e melanoma. O'Grady e colaboradores estudaram as MMPs nos cânceres da pele não-melanoma. Concluíram que a MMP-2, a MMP-9, o TIMP-1 e o TIMP-2 apresentam um importante papel na patogênese dos cânceres da pele não-melanoma (O'Grady, Dunne et al. 2007). Orimoto e colaboradores encontraram expressão da MMP-2 em cânceres da pele não-melanoma (carcinoma basocelular e carcinoma espinocelular) e em melanomas (Orimoto, Neto et al. 2008).

### **2.2.2. Metaloproteinases e melanoma**

O melanoma é caracterizado pela sua alta capacidade de invasão e de formação de metástases. A disseminação das células tumorais é a principal causa de morte nos pacientes oncológicos. A degradação e o remodelamento da matriz extracelular e da membrana basal são etapas importantes neste processo.

Diferentes sistemas enzimáticos proteolíticos, incluindo o sistema ativador do plasminogênio e a família das MMPs, apresentam um importante papel na progressão do melanoma. Em especial, o balanço entre as MMPs e seus inibidores TIMPs é um fator crítico na progressão do melanoma (Hofmann, Westphal et al. 2000).

O conceito clássico de um aumento na atividade das MMPs, resultando em aumento da degradação da matriz extracelular e, por consequência, numa facilitação da invasão das células tumorais e da formação de metástases, está, atualmente, ultrapassado por um sistema muito mais amplo de funções biológicas das MMPs no desenvolvimento e progressão tumoral. Existe um papel das MMPs relacionado a sua interação com proteínas que não compõem a matriz extracelular, incluindo fatores de crescimento e seus receptores, mediadores da apoptose e moléculas de adesão celular, tais como membros da família das integrinas e CD44 (Hofmann, Houben et al. 2005).

As células do melanoma podem expressar várias MMPs, incluindo MMP-1, MMP-2, MMP-9, MMP-13, MT1-MMP, assim como TIMP-1, TIMP-2 e TIMP-3 (Hofmann, Houben et al. 2005).

Redondo e colaboradores concluíram que a expressão da MMP-2 pode estar associada com a progressão do melanoma. Entretanto, os níveis séricos circulantes de MMP-2 e MMP-9 apresentaram baixa sensibilidade e baixa especificidade como marcadores em pacientes com esta neoplasia (Redondo, Lloret et al. 2005).

Väisänen e colaboradores demonstraram um aumento de expressão da MMP-2 correlacionado com uma desordem da arquitetura, assim como com atipia

das lesões melanocíticas e metástases hematogênicas (Väisänen, Tuominen et al. 1996). Foi também relatado correlação entre um aumento da expressão da MMP-2 e um prognóstico desfavorável em pacientes com melanoma. A correlação entre um aumento de expressão da MMP-2 e uma baixa taxa de sobrevida foi um fator independente do Breslow e do nível de Clark destas lesões (Väisänen, Kallioinen et al. 1998). Mais recentemente, Väisänen e colaboradores evidenciaram que a MMP-2 pode ser reconhecida como um novo marcador de prognóstico nos pacientes com melanoma e que a expressão da MMP-9 não está associada ao curso clínico das lesões de melanoma (Väisänen, Kallioinen et al. 2008).

A presença da MMP-2 em sua forma ativa é importante na progressão do melanoma, ressaltando a relevância da MT1-MMP como um ativador da enzima (Kurschat, Zigrino et al. 1999). As expressões da MMP-2 e da MT1-MMP estão aumentadas em lesões de melanoma primário e metastático (Hofmann, Westphal et al. 2000).

No melanoma, as células do estroma adjacente ao tumor, em sua interface invasora, expressam MMP-2. Nesta área invasora, a MMP-2 mostra-se ativa (Hofmann, Eggert et al. 2005). As células que expressam MMP-2 também expressam MT1-MMP e TIMP-2. Tanto as células tumorais positivas para a MMP-2, quanto as positivas para a MT1-MMP estão localizadas na interface entre o estroma adjacente ao tumor e as células tumorais invasoras, sugerindo uma via proteolítica diretamente mediada por estas células (Hofmann, Eggert et al. 2003; Hofmann, Houben et al. 2005). Um estudo de zimografia *in situ* confirmou que a atividade da enzima MMP-2 está localizada nesta interface entre o estroma e a borda tumoral, área em que as células do melanoma interagem com a matriz

extracelular que as cerca, contribuindo para a habilidade invasora da neoplasia (Kurschat, Wickenhauser et al. 2002).

A produção de MMP-2 pelo hospedeiro também é importante para a formação experimental de metástases. As células tumorais induzem à liberação de MMP-2 a partir de fibroblastos normais (Hofmann, Houben et al. 2005; Chen, Lu et al. 2006).

Otto e colaboradores avaliaram a expressão de MMPs (MMP2 e MT1-MMP), quimiocinas e seus receptores como preditores de risco para a progressão do melanoma, ou seja, sua correlação com a presença de micrometástases nos linfonodos sentinelas. Os autores encontram uma correlação inversa entre a expressão das MMPs, das quimiocinas e de seus receptores e a presença de micrometástases nos linfonodos. No entanto, concluem que seus resultados não excluem a relevância dos fatores investigados na promoção de metástases tumorais (Otto, Starz et al. 2007).

Yoshino e colaboradores demonstraram uma correlação significativa entre um nível sérico aumentado de TIMP-2 e a progressão tumoral em pacientes com melanoma (Yoshino, Kageshita et al. 2008).

O balanço entre a expressão das MMPs e de seus TIMPs, parece ser determinante na progressão tumoral (Hofmann, Houben et al. 2005). Neste sentido, um aumento na expressão de TIMP-1, TIMP-2 e TIMP-3 demonstrou inibir o crescimento tumoral no melanoma (Hofmann, Westphal et al. 2000). Os TIMPs parecem inibir a neovascularização tumoral. O aumento da expressão dos TIMPs pode tanto apresentar um efeito antimetastático, quanto indicar um prognóstico reservado para o paciente (Hofmann, Houben et al. 2005).



Além das células tumorais e das células do estroma, as células imunes que infiltram o tumor também apresentam a capacidade de expressar as MMPs e os TIMPs, contribuindo, assim, para a invasão das células tumorais e para a formação de metástases (Hofmann, Houben et al. 2005).

### **2.2.3. Novas perspectivas: a interação das MMPs com moléculas de adesão celular no melanoma**

Existem indícios da interação entre as MMPs e as moléculas de adesão. As integrinas são uma grande família de glicoproteínas transmembrana compostas de subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  interligadas através de uma ligação não-covalente. As integrinas são receptores multifuncionais que mediam a ancoragem celular à matriz extracelular e a motilidade celular, além de regularem a expressão gênica e a apoptose (Hofmann, Houben et al. 2005). As integrinas mediam o contato celular com a fibronectina, com os colágenos e com a laminina, componentes da matriz extracelular (Miller e MihmJr 2006).

A expressão da integrina ligadora de vitronectina  $\alpha_v\beta_3$  foi relacionada à capacidade de geração tumoral, à capacidade de invasão e ao potencial metastático. A expressão de  $\alpha_v\beta_3$  está aumentada em linhagens celulares de melanoma metastático. Integrinas  $\beta_3$  estão predominantemente expressas na fase de crescimento vertical dos melanomas primários (Hofmann, Houben et al. 2005).

A integrina  $\alpha_v\beta_3$  induz à expressão da MMP-2 (Miller e MihmJr 2006). Foi demonstrado que a MMP-2 ativa liga-se diretamente à integrina  $\alpha_v\beta_3$ , facilitando a

degradação da matriz extracelular e a invasão celular (Hofmann, Houben et al. 2005). A coexpressão da MMP-2 e da integrina  $\alpha_v\beta_3$  podem ser necessárias para a invasão celular no melanoma e para a formação de metástases (Hofmann, Westphal et al. 2000).

Um aumento na expressão de MMP-2 e a presença de MMP-2 funcionalmente ativa foram associados com a progressão do melanoma. A presença de MMP-2 em sua forma ativa foi observada em linhagens celulares com alta capacidade de invasão. Além disso, um aumento na expressão de TIMP-1, TIMP-2 e TIMP-3 demonstrou inibir a proteólise tumoral e a invasão celular do melanoma (Hofmann, Westphal et al. 2000).

### **2.3. Métodos para o estudo da MMP-2 e do TIMP-2**

Existem diversos métodos para confirmar a presença das MMPs e dos TIMPs nos tecidos estudados, sendo que, usualmente, tais técnicas são utilizadas em pesquisas. São reconhecidos os seguintes métodos: zimografia, imuno-histoquímica, Western-blotting, Northern blot, hibridização *in situ*, reação em cadeia da polimerase, radioisótopo, citometria de fluxo e o método de ELISA.

As técnicas mais utilizadas são a zimografia e a imuno-histoquímica. A zimografia permite determinar o nível de atividade das enzimas no material estudado. Já a imuno-histoquímica proporciona a demonstração indistinguível das formas inativas e ativas das enzimas presentes no tecido analisado (Paquet, Nusgens et al. 1998; Lê, Dauchot et al. 1999; Taylor, Shi et al. 2002).

### **2.3.1. Imuno-histoquímica**

Imuno-histoquímica é a técnica utilizada para a identificação de antígenos específicos em tecidos ou células, baseada no reconhecimento antígeno-anticorpo (Taylor, Shi et al. 2002).

A técnica tradicional de imunoperoxidase com avidina-biotina utiliza tecidos rotineiramente processados e incluídos (emblocados) em parafina. Primeiramente, devem ser feitas a desparafinização e a reidratação do espécime. Após, é realizada a recuperação antigênica e o bloqueio da peroxidase endógena (bloqueio de anticorpos não-específicos). Na sequência, aplicam-se os anticorpos primário e secundário, juntamente ao sistema de amplificação complexo avidina-biotina. Por fim, é adicionada uma solução cromógena que permite a visualização da reação (Taylor, Shi et al. 2002).

Tradicionalmente, os estudos imuno-histoquímicos envolvendo metaloproteinases utilizavam como cromógeno a substância diaminobenzidina (DAB) (contracorada com hematoxilina), que proporciona uma coloração acastanhada (marrom) à reação imuno-histoquímica (Bonamigo, Bakos et al. 2005; Bakos, Bakos et al. 2007).

No estudo imuno-histoquímico das lesões melanocíticas, pode-se encontrar dificuldade na diferenciação entre a coloração do DAB (marrom) e a coloração da melanina (também marrom).

Para melhorar a visualização e auxiliar na diferenciação, propõe-se uma modificação na técnica, substituindo a contracoloração com hematoxilina pela contracoloração com Giemsa. Com essa modificação, o pigmento da melanina foi

corado de azul-esverdeado, contrastando com a coloração do anticorpo/DAB que permaneceu marrom, facilitando a avaliação do exame (Salvio e Marques 2006).

Encontra-se também publicado um estudo imuno-histoquímico sobre melanoma, empregando a técnica de imuno-histoquímica com fosfatase alcalina, a qual pigmenta de vermelho o anticorpo utilizado, permitindo a diferenciação do pigmento marrom da melanina (Eliopoulos, Mohammed et al. 2002).

Outra alternativa para o estudo imuno-histoquímico das MMPs no melanoma foi descrita por Redondo e colaboradores. Estes autores estudaram a MMP-2 e a MMP-9 no melanoma e empregaram a técnica da imuno-histoquímica utilizando tanto o DAB como cromógeno, quanto o 3-amino-9-etil carbazole (AEC) (corante vermelho) (Redondo, Lloret et al. 2005). Também Väisänen e colaboradores estudaram as MMP-2 e MMP-9 no melanoma, utilizaram a técnica de imuno-histoquímica com a solução cromógena com AEC e verificaram o anticorpo corado de vermelho em contraste com o marrom da melanina (Väisänen, Kallioinen et al. 2008).

### 3. JUSTIFICATIVA

O melanoma cutâneo é uma das neoplasias com maiores taxas de incidência no Brasil e no mundo e existem importantes dados quanto aos seus índices de morbimortalidade.

Os fatores prognósticos histopatológicos com independência estatística são a espessura tumoral e a ulceração. Os demais fatores estão, em geral, associados a esses principais preditores. Os mecanismos etiopatogênicos que influem na espessura e no desenvolvimento da ulceração não estão completamente esclarecidos, o que estimula a investigação sobre os mediadores biológicos, em uma área de estudos a ser progressivamente desenvolvida.

As MMPs são endopeptidases que demonstram possuírem ações que facilitam a invasão e a disseminação tumoral, beneficiando a progressão da doença. Porém, não há estudos específicos correlacionando a presença de determinadas MMPs e todos os fatores de prognóstico histopatológicos para o melanoma cutâneo descritos na literatura.

A análise da expressão da MMP-2 em melanomas e metástases cutâneas poderá revelar que a sua presença está relacionada a fatores histopatológicos determinados e configurar-se como um elemento biológico marcador definitivo e independente no prognóstico do paciente.

**Além destes aspectos principais, a confirmação da importância desta enzima no pior prognóstico da doença repercute no direcionamento de estudos farmacológicos para o bloqueio da síntese e da atividade da mesma.**

**O estudo da expressão do TIMP-2 em melanomas pode auxiliar na compreensão da complexa relação deste com a MMP-2.**

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. Objetivo Geral

*Avaliar a expressão imuno-histoquímica da metaloproteinase-2 da matriz (MMP-2) e do inibidor tecidual da metaloproteinase-2 da matriz (TIMP-2) no melanoma cutâneo primário, verificando suas relações com os fatores prognósticos histopatológicos da neoplasia (definidos pelo Grupo Multicêntrico e Multidisciplinar Brasileiro para Estudo do Melanoma).*

### 4.2. Objetivos Específicos

4.2.1. Avaliar a expressão imuno-histoquímica da MMP-2 no melanoma cutâneo primário em relação à idade, ao sexo, à topografia e aos subtipos clínico-histopatológicos do melanoma.

4.2.2. Avaliar a expressão imuno-histoquímica da MMP-2 nas metástases cutâneas do melanoma.

4.2.3. Avaliar a expressão imuno-histoquímica do TIMP-2 no melanoma cutâneo primário em relação à idade, ao sexo, à topografia e aos subtipos clínico-histopatológicos do melanoma.

4.2.4. Avaliar a expressão imuno-histoquímica do TIMP-2 nas metástases cutâneas de melanoma.



## 5. REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO E DA REVISÃO DA LITERATURA

- (2009). <[http://www](http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=335)> inca gov br/conteudo\_view.asp?id=335 2008
- Azevedo, G. and S. Mendonça (1992). "Risco crescente de melanoma de pele no Brasil." Rev. Saúde públ. 26(4): 290-4.
- Bakos, L., M. Wagner, et al. (2002). "Sunburn, sunscreens, and phenotypes: some risk factors for cutaneous melanoma in souther Brazil." Int J Dermatol 41: 557-562.
- Bakos, R. M., L. Bakos, et al. (2007). "Immunohistochemical expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 in melanocytic nevi is altered by ultraviolet B." Photodermatol Photoimmunol Photomed 23: 250-254.
- Balch, C. M., A. C. Buzaid, et al. (2001). "Final Version of the American Joint Committee on Cancer Staging System for Cutaneous Melanoma." J Clin Ocol 19: 3635-3648.
- Bonamigo, R. R., L. Bakos, et al. (2005). "Could matrix metalloproteinase-9 be a link between *Demodex folliculorum* and rosacea?" J Eur Acad Dermatol Venereol 19: 638-659.
- Bonfá, R., R. R. Bonamigo, et al. (2007). Primary Cutaneous Melanoma: Epidemiologic Study in a Hospital of Porto Alegre. Annals of 7a. Conferência Brasileira sobre Melanoma.
- Brenneisen, P., H. Sies, et al. (2002). "Ultraviolet-B irradiation and matrix metalloproteinases: from induction via signaling to initial events." Ann. N. Y. Acad. Sci. 973: 31-43.
- Chang, C. and Z. Werb (2001). "The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis." Trends Cell Biol 11: S37.
- Chen, G.-S., M.-P. Lu, et al. (2006). "Differential expression of matrix metalloproteinase-2 by fibroblasts in co-cultures with keratinocytes, basal cell carcinoma and melanoma." J Dermatol 33: 609-615.
- Chu, D. H., A. R. Haake, et al. (2003). The Structure and Development of Skin. Dermatology. Fitzpatrick.
- Clark, I. M., T. E. Swingler, et al. (2008). "The regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors." Int J Biochem Cell Biol 40: 1362-1378.
- Cummins, D. L., J. M. Cummins, et al. (2006). "Cutaneous Malignant Melanoma." Mayo Clin Proc. 81(4): 500-507.
- Dennis, L. K., M. J. Vanbeek, et al. (2008). "Sunburns and Risk of Cutaneous Melanoma: Does Age Matter? A Comprehensive Meta-Analysis." Ann Epidemiol 18: 614-627.
- Desmond, R. A. and S.-j. Soong (2003). "Epidemiology of malignant melanoma." Surg Clin N Am 83: 1-29.

- Dummer, R., A. Hauschild, et al. (2008). "Cutaneous malignant melanoma: ESMO Clinical Recommendations for diagnosis, treatment and follow-up." Ann of Oncol 19(supplement 2): ii86-88.
- Eide, M. J., M. A. Weinstock, et al. (2009). "The association of physician-specialty density and melanoma prognosis in the United States, 1988 to 1993." J Am Acad Dermatol 60: 51-8.
- Eliopoulos, P., M. Q. Mohammed, et al. (2002). "Overexpression of Her-2 in thick melanoma." Melanoma Res 12: 139-145.
- Fingleton, B. (2008). "MMPs as therapeutic targets - Still a viable option?" Semin Cell Dev Biol 19: 61-68.
- Fisher, G. J., Z. Wang, et al. (1997). "Pathophysiology of Premature Skin Aging Induced by Ultraviolet Light." N Engl J Med 337(20): 1419-1428.
- Flórez, A. and M. Cruces (2004). "Melanoma epidemic: True or false?" Int J Dermatol 43: 405-407.
- Fortes, C., S. Mastroeni, et al. (2007). "The association between residential pesticide use and cutaneous melanoma." Eur J Cancer 43(6): 1066-75.
- Garbe, C. and T. K. Eigentler (2007). "Diagnosis and treatment of cutaneous melanoma: state of the art 2006." Melanoma Res 17: 117-127.
- Garbe, C., A. Hauschild, et al. (2007). "Evidence and interdisciplinary consensus-based German guidelines: diagnosis and surveillance of melanoma." Melanoma Res 17: 393-399.
- Goldberg, M. S., J. T. Doucette, et al. (2007). "Risk factors for presumptive melanoma in skin cancer screening: American Academy of Dermatology National Melanoma/ Skin Cancer Screening Program experience 2001-2005." J Am Acad Dermatol 57: 60-6.
- Gray-Schopfer, V., C. Wellbrock, et al. (2007). "Melanoma biology and new targeted therapy." Nature 445: 851-7.
- Halpern, A. C., A. A. Marghoob, et al. (2003). Clinical Characteristics. Cutaneous Melanoma. C. M. Balch, A. N. Houghton, A. J. Sober and S.-j. Soong: 135-158.
- Hofmann, U. B., A. A. O. Eggert, et al. (2003). "Expression of Matrix Metalloproteinases in the Microenvironment of Spontaneous and Experimental Melanoma Metastases Reflects the Requirements for Tumor Formation." Cancer Res 63: 8221-8225.
- Hofmann, U. B., A. A. O. Eggert, et al. (2005). "Stromal cells as the major source for matrix metalloproteinase-2 in cutaneous melanoma." Arch Dermatol Res 297.
- Hofmann, U. B., R. Houben, et al. (2005). "Role of matrix metalloproteinases in melanoma cell invasion." Biochimie 87: 307-314.
- Hofmann, U. B., J. R. Westphal, et al. (2000). "Matrix Metalloproteinases in Human Melanoma." J Invest Dermatol 115: 337-344.
- Hofmann, U. B., J. R. Westphal, et al. (2000). "Coexpression of Integrin  $\alpha_v\beta_3$  and Matrix Metalloproteinase-2 (MMP-2) Coincides with MMP-2 Activation: Correlation with Melanoma Progression." J Invest Dermatol 115: 625-632.
- Hofmann, U. B., J. R. Westphal, et al. (2000). "Expression and activation of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and its co-localization with

- membrane-type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) correlate with melanoma progression." J Pathol 191: 245-256.
- Koivukangas, V., M. Kallioinen, et al. (1994). "UV irradiation induces the expression of gelatinases in human skin *in vivo*." Acta Derm. Venereol. 74(4): 279-82.
- Konstantinopoulos, P. A., M. V. Karamouzis, et al. (2008). "Matrix metalloproteinase inhibitors as anticancer agents." Int J Biochem Cell Biol 40: 1156-1168.
- Krengel, S., M. Alexander, et al. (2002). "MMP-2, TIMP-2 and MT1-MMP are differentially expressed in lesional skin of melanocytic nevi and their expression is modulated by UVB-light." J Cutan Pathol 29: 390-396.
- Kurschat, P., C. Wickenhauser, et al. (2002). "Identification of activated matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) as the main gelatinolytic enzyme in malignant melanoma by *in situ* zymography." J Pathol 197: 179-187.
- Kurschat, P., P. Zigrino, et al. (1999). "Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinase-2 Regulates Matrix Metalloproteinase-2 Activation by Modulation of Membrane-type 1 Matrix Metalloproteinase Activity in High and Low Invasive Melanoma Cell Lines." J Biol Chem 274: 21056-21062.
- Landman, G. and etal (2003). "Consenso para o laudo anatomopatológico do melanoma cutâneo: Grupo Multicêntrico e Multidisciplinar Brasileiro para Estudo do Melanoma (GBM)." Acta Oncológica Brasileira 23(10).
- Lê, J., P. Dauchot, et al. (1999). "Quantitative zymography of matrix metalloproteinases by measuring hydroxyproline: application to gelatinases A and B." Electrophoresis 20(14): 2824-9.
- Markovic, S. N., L. A. Erickson, et al. (2007). "Malignant Melanoma in the 21st Century, Part 1: Epidemiology, Risk Factors, Screening, Prevention, and Diagnosis." Mayo Clin Proc. 82(3): 364-380.
- Markovic, S. N., L. A. Erickson, et al. (2007). "Malignant Melanoma in the 21st Century, Part 2: Staging, Prognosis, and Treatment." Mayo Clin Proc. 82(4): 490-513.
- Marks, R. (2000). "Epidemiology of melanoma." Clin Exp Dermatol 25: 459-463.
- Martin, M. D. and L. M. Matrisian (2007). "The other side of MMPs: Protective roles in tumor progression." Cancer Metastasis Rev 26: 717-724.
- Miller, A. J. and M. C. MihmJr (2006). "Melanoma." N Engl J Med 355: 51-65.
- Murphy, G. and H. Nagase (2008). "Progress in matrix metalloproteinase research." Mol Aspects Med 29: 290-308.
- Noël, A., M. Jost, et al. (2008). "Matrix metalloproteinases at cancer tumor-host interface." Semin Cell Dev Biol 19: 52-60.
- O'Grady, A., C. Dunne, et al. (2007). "Differential expression of matrix metalloproteinase (MMP)-2, MMP-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1 and TIMP-2 in non-melanoma skin cancer: implications for tumour progression." Histopathology 51: 793-804.
- Ohnishi, Y., S. Tajima, et al. (2001). "Coordinate expression of membrane type-matrix metalloproteinases-2 and 3 (MT2-MMP and MT3-MMP) and

- matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in primary and metastatic melanoma cells." Eur J Dermatol 11: 420-3.
- Orimoto, A. M., C. F. Neto, et al. (2008). "High numbers of human skin cancers express MMP-2 and several integrin genes." J Cutan Pathol 35: 285-291.
- Otto, K., H. Starz, et al. (2007). "Overexpression of Matrix Metalloproteinases, Chemokines, and Chemokine Receptors Relevant for Metastasis in Experimental Models not as Indication of Lymph Node Metastases in Human Melanoma." Arch Dermatol 143(7): 947-8.
- Paquet, P., B. V. Nussgens, et al. (1998). "Gelatinases in drug-induced toxic epidermal necrolysis." Eur J Clin Invest 28(7): 528-32.
- Passeron, T., S. G. Coelho, et al. (2007). "Immunohistochemistry and in situ hybridization in the study of human skin melanocytes." Exp Dermatol 16: 162-170.
- Redondo, P., P. Lloret, et al. (2005). "Expression and serum levels of MMP-2 and MMP-9 during human melanoma progression." Clin Exp Dermatol 30: 541-545.
- Roberts, D. L. L., A. V. Anstey, et al. (2002). "U. K. guidelines for the management of cutaneous melanoma." Br J Dermatol 146: 7-17.
- Salvio, A. G. and M. E. A. Marques (2006). "Imuno-histoquímica para identificação de células neoplásicas no infiltrado ativo de melanomas finos." J Bras Patol Med Lab 42(2): 143-148.
- Seltzer, J. and A. Eisen (2003). O Papel das Metaloproteínas da Matriz na Remodelação do Tecido Conjuntivo. Dermatologia. Fitzpatrick.
- Sober, A. J., T.-Y. Chuang, et al. (2001). "Guidelines of care for primary cutaneous melanoma." J Am Acad Dermatol 45: 579-86.
- Taylor, C. R., S.-R. Shi, et al. (2002). Techniques of Immunohistochemistry: Principles, Pitfalls and Standardization. Diagnostic Immunohistochemistry. D. DABBS. Philadelphia, Chapman and Hall Medical: 3-43.
- Thewes, M., W. I. Woret, et al. (1999). "Stromelysin-3 (ST-3): immunohistochemical characterization of the matrix metalloproteinase (MMP)-11 in the benign and malignant skin tumours and other skin disorders." Clin Exp Dermatol 24: 122-6.
- Thompson, J. F., R. A. Scolyer, et al. (2005). "Cutaneous melanoma." The Lancet 365: 687-701.
- Väisänen, A., M. Kallioinen, et al. (1998). "Prognostic value of MMP-2 immunoreactive protein (72 kD Type IV Collagenase) in primary skin melanoma." J Pathol 186: 51-58.
- Väisänen, A., H. Tuominen, et al. (1996). "Matrix Metalloproteinase-2 (72 kD Type IV Collagenase) Expression occurs in the early stage of human melanocytic tumour progression and may have prognostic value." J Pathol 180: 283-289.
- Väisänen, A. H., M. Kallioinen, et al. (2008). "Comparison of the prognostic value of matrix metalloproteinases 2 e 9 in cutaneous melanoma." Hum Pathol 39: 377-385.

- Venegas, L. F. P., C. Flores, et al. (1992). "Melanoma maligno cutâneo no Rio Grande do Sul: estudo de 101 casos." Rev. Ass. Med. Brasil 38(3): 122-6.
- Visse, R. and H. Nagase (2003). "Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases." Circ Res 92: 827-839.
- Yoshino, Y., T. Kageshita, et al. (2008). "Clinical relevance of serum levels of matrix metalloproteinase-2, and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and -2 in patients with malignant melanoma." J Dermatol 35: 206-214.

## 6. ARTIGOS

### **6.1. Artigo científico redigido em inglês**

## **1. MMP-2 e TIMP-2 in cutaneous melanoma: association with prognostic factors and description in cutaneous metastases.**

**Authors:** Maria Carolina Widholzer Rey<sup>1</sup>, Renan Rangel Bonamigo<sup>2</sup>, André Cartell<sup>3</sup>, Roque Furian<sup>4</sup>, Raquel Bonfá<sup>5</sup>, Rafael Bonfá<sup>6</sup>

**Institution:** Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA) – Brazil and Serviço de Patologia do Complexo Hospitalar Santa Casa de Porto Alegre – Brazil.

1 – Dermatologist, student in the Graduate Program of Pathology at Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), POA, RS, Brazil. 2 – Professor in the Graduate Program of Pathology at Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), POA, RS, Brazil. 3 – Professor of Pathology at Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), POA, RS, Brazil. 4 - Professor of Pathology at Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), POA, RS, Brazil. 5 – Medical student at Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), POA, RS, Brazil. 6 – Dermatologist, POA, RS, Brazil.

**Key-words:** melanoma, matrix metalloproteinases, gelatinases, prognosis, metastases.



**Conflict of interests:** none.

**Financial support:** scholarship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES – Brazil.

**Address for correspondence:** Rua Gregor Mendel 90, POA/RS – Brasil. CEP 90480-150. E-mail: caro2rey@yahoo.com.br

2. Article to be submitted to the *Journal of Cutaneous Pathology*.

### 3. Abstract

**Introduction:** matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) is expressed in thick cutaneous melanomas, but there is little information on relations between this gelatinase with clinical aspects and all the other histopathological prognostic factors. There are few reports on its expression in cutaneous melanoma metastases.

**Methods:** a cross-sectional evaluation of cases of primary cutaneous melanomas and cutaneous metastases of melanoma was performed to evaluate the immunohistochemical expressions of MMP-2 and its tissue inhibitor (TIMP-2). Associations with clinical aspects and with the histological prognostic factors were verified. The associations with  $P < 0.05$  were considered statistically significant.

**Results:** 73 cases of primary cutaneous melanomas and 13 cases of cutaneous metastases were studied. There was an association between the expression of MMP-2 and younger ages, location in lower limbs, subtype of superficial spreading, Breslow index, and high Clark level. The expression of TIMP-2 was similar. There was no association between MMP-2 and TIMP-2 and one of the primary cutaneous melanoma growth phases. All the cases of metastases expressed MMP-2 and TIMP-2.

**Conclusions:** MMP-2 can participate in the initial phases of melanoma growth, but it is particularly present in invasive melanomas. Its expression is mainly found in the superficial spreading subtype and in younger patients. TIMP-2 has a immunohistochemical expression similar to that of MMP-2.

## Introduction

The incidence of melanoma has been growing in several regions of the world and it is considered a serious public health problem [1-7]. Although it represents only 4% of all malignant skin neoplasias, it accounts for 80% of deaths from skin cancers[8].

Cutaneous melanoma presents more often in Caucasian populations, and there is clear evidence that light-skinned individuals are more predisposed to develop it [3, 4]. Several studies demonstrated that exposure to ultraviolet radiation (UVR) is the main environmental risk factor to develop melanoma[5, 7].

Tumor thickness according to the Breslow index is considered the main histopathological prognostic factor of the neoplasia [4]. However, in 2003 a guideline of the GBM- Grupo Multicêntrico e Multidisciplinar Brasileiro para Estudo do Melanoma (*Brazilian Multicentric and Multidisciplinary Group for the Study of Melanoma*) recommended that, besides tumor thickness, the anatomopathological report on the melanoma should contain the following parameters, which would also be used as prognostic factors: histological subtype, ulceration, growth phase (if radial or vertical), Clark level, mitotic index, peritumoral lymphocytic inflammatory infiltrate, intratumoral inflammatory infiltrate, lymphatic and blood vessel invasion, perineural invasion, regression, microscopic satellitosis and surgical margins [9].

A varied series of biological mediators exert pathogenic actions in the development of the melanoma and have effects that definitely influence the changes mentioned in histopathological factors; among these mediators are the matrix metalloproteinase enzymes (MMPs), which were originally described with

predominant action on the homeostasis of the extracellular matrix, by cleavage of the substrates that are the components of this matrix[10, 11].

Among the MMPs that contribute to tumor progression is matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) which has the ability to degrade type IV collagen, promote angiogenesis and mitogenesis. The elevation of the activity of this enzyme in various human malignancies has already been described [12].

MMP-2 is produced mainly from mesenchymal cells (fibroblasts) although keratinocytes, melanocytes, endothelial cells, macrophages and neutrophils can produce it [13].

Ultraviolet radiations A (UV-A) and B (UV-B) induce secretion and the action of MMP-2 [14].

A family with four specific MMP inhibitors, known as tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs), participate in the control of MMP activity [10, 11]. The TIMPs selectively and reversibly inhibit the MMPs and the tissue inhibitor of metalloproteinase -2 (TIMP-2) regulates the activation of MMP-2 [15, 16].

MMP-2 is acknowledged to be associated with the highest Breslow indices and with the progression of melanoma; but no studies are found relating MMP-2 to the other histopathological prognostic factors. The presence of TIMP-2 in association with the whole ensemble of these factors was also not studied [17].

It may be important to acknowledge the participation of these mediators in the configuration of the histological profile of melanoma prognosis to gain a better understanding of the latter's evolutionary behavior, and help define the therapeutic options blocking the action of MMP-2.

The present study proposed to evaluate the immunohistochemical expression of MMP-2 and of TIMP-2 in cutaneous melanoma, particularly as to its relations with the histopathological prognostic factors and in the cutaneous metastases of melanoma.

## 4. Material and Methods

The research was approved by the Committee of Research in Ethics at the Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre – UFCSPA (Federal University of Health Sciences of Porto Alegre) and the Complexo Hospitalar da Santa Casa de Porto Alegre- CHSC.( Santa Casa de Porto Alegre Hospital Complex – CHSC)

A cross-sectional and retrospective study was performed on the cases of primary cutaneous melanoma and cutaneous metastases of melanoma from the Surgery and Pathology Services at Hospital Santa Rita (Complexo Hospitalar Santa Casa, Porto Alegre – Brazil), between 2003 and 2005.

The variables evaluated in the study were age, sex, lesion topography, histological subtype of the melanoma, histopathological factors recommended by GBM, skin metastases and the immunohistochemical expression of MMP-2 and TIMP-2 in the primary cutaneous melanomas and cutaneous metastases of melanoma.

### *Histopathology*

The specimens were fixed in formalin and embedded in paraffin. The slides were stained with hematoxylin-eosin (HE) and evaluated to confirm melanoma in the excisional biopsy and to verify the presence of the prognostic factors of GBM. The cutaneous metastases were confirmed by a new histopathological evaluation.

Afterwards, the material was sent for immunohistochemistry of the MMP-2 and TIMP-2.

#### *Immunohistochemistry Technique*

The traditional avidin-biotin immunoperoxidase technique was used as previously described [18]. Commercial monoclonal antibodies were used for MMP-2 (Novocastra<sup>®</sup> Laboratories, Newcastle upon Tyne, United Kingdom) and TIMP-2 (Novocastra<sup>®</sup> Laboratories, Newcastle upon Tyne, United Kingdom). The following chromogen solutions were applied to visualize the antigen-antibody complex: diaminobenzidine (DAB) and 3-Amino-9-Ethylcarbazole (AEC) counterstained with Giemsa.

#### **4.1. Histochemistry Evaluation for MMP-2 and TIMP-2**

The slides were examined under an optical microscope by a dermatopathologist (A.C.) experienced in evaluating immunohistochemistry slides to study metalloproteinases.

In order to analyze the expressions of MMP-2 and of TIMP-2, the semi-quantitative method was used, in which: 0 was absence of expression; 1+ weak expression; 2+ moderate expression and 3+ strong expression.

In primary melanomas the expressions of MMP-2 and TIMP-2 were evaluated in the stroma, in the vessels, in the epidermal tumor cells, in the dermal tumor cells and in the keratinocytes. The tumor cells and stroma in the metastases were evaluated. The slides were analyzed separately with chromogens DAB and



AEC, but for purposes of study homogenization it was decided to read the slides stained with AEC, which made it easier to differentiate the color that results from the antigen-antibody chemical reaction with melanin. This technique for this purpose is described in the literature [17, 19].

*Statistical analysis*

**The Spearman correlation coefficient and the Student t significance test were used to evaluate age, Breslow thickness, Clark level, mitotic index, peritumoral lymphocytic inflammatory infiltrate and intratumoral inflammatory infiltrate; the Mann-Whitney U test for sex, the growth phase, the surgical margins and the metastases; the Kruskal-Wallis H test for lesion topography and the histological subtype; the Chi-square test of linear tendency for ulceration and regression.**

**A level of 5% ( $P < 0.05$ ) was used to consider statistical relevance. The data were analyzed using the SPSS 15.0 statistical program.**

## Results

### 4.2. General description

Out of a total of 86 cases evaluated, 73 were primary cutaneous melanomas and 13 were cutaneous metastases of melanoma.

The general mean age of the patients was 56.9 years, 49 (57%) female and 37 (43%) male. The mean age of the patients with primary melanoma was 54.97 years, 44 were female and 29 were male; in the cases of cutaneous metastases, the mean age was 62.46 years, 5 were female and 8 were male.

As to the primary lesions, their topographical distribution corresponded to 24 (33%) cases located on the back; 17 (23%) on the lower limbs; 17 (23%) on the head and neck region; 9 (12%) on the upper limbs and 6 (8%) on the area corresponding to the anterior chest and abdomen.

In these primary lesions, the following distribution was observed, according to histological subtype: 50 (69%) cases superficial spreading melanoma type; 11 (15%) of the lentigo maligna type; 8 (11%) nodular type and 4(6%) accral type.

The depth of these tumors was evaluated by the Breslow index, which was distributed as follows: 14 (19%) lesions were *in situ*; 32 (44%) had a Breslow less than or equal to 1.0 mm; 10 (10%) were greater than 1.0 mm and less than or equal to 2.0 mm; 3 (4%) were greater than 2.0 mm and less than or equal to 4.0 mm and 14 (19%) of the lesions presented a Breslow greater than 4.0 mm.

All the slides of primary cutaneous melanoma and of cutaneous metastases of melanoma, expressed the enzyme and its inhibitor.

As to the expression of MMP-2 in the primary cutaneous melanoma, 6 cases (8%) presented 1+; 19 (26%), 2+; and 48 (66%), 3+. When the expression of TIMP-2 was evaluated in primary cutaneous melanoma, 16 cases (22%) presented 1+; 26 (36%), 2+; and 31 (43%), 3+.

As to MMP-2 expression, metastases presented in 4 cases (31%), 1+; in 2 (15%), 2+; and in 7 (54%), 3+. As to TIMP-2 expression in metastases, 5 cases (39%) presented 1+; 2 (15%), 2+; and 6 (46%), 3+.

**Table 1 shows the results described above.**

Table 1.

Table 1 – General characteristics of the patients and of the melanomas (n=86)

| Variable                   | n = 86    |
|----------------------------|-----------|
| Age, mean±SD (years)       | 56.9±14.9 |
| Female sex, n° (%)         | 49 (57)   |
| Type of lesion, n° (%)     |           |
| Primary tumor              | 73 (85)   |
| Metastasis                 | 13 (15)   |
| Topography*, n° (%)        | n = 73    |
| Dorsum                     | 24 (33)   |
| Lower limb                 | 17 (23)   |
| Head and neck              | 17 (23)   |
| Upper limb                 | 9 (12)    |
| Anterior chest and abdomen | 6 (8)     |
| Histological subtype*      | n = 73    |

|                                |         |
|--------------------------------|---------|
| Superficial spreading          | 50 (69) |
| Lentigo maligna                | 11 (15) |
| Nodular                        | 8 (11)  |
| Accral                         | 4 (6)   |
| Breslow thickness              | n = 73  |
| <i>in situ</i>                 | 14 (19) |
| ≤ 1.0 mm                       | 32 (44) |
| > 1.0 mm - ≤ 2.0 mm            | 10 (10) |
| > 2.0 mm - ≤ 4.0 mm            | 3 (4)   |
| > 4.0 mm                       | 14 (19) |
| Immunohistochemical expression |         |
| Primary tumor                  | n = 73  |
| Metalloproteinase-2            |         |
| +                              | 6 (8)   |
| ++                             | 19 (26) |
| +++                            | 48 (66) |
| TIMP-2 Inhibitor               |         |
| +                              | 16 (22) |
| ++                             | 26 (36) |
| +++                            | 31 (43) |
| Metastases                     | n = 13  |
| Metalloproteinase-2            |         |
| +                              | 4 (31)  |
| ++                             | 2 (15)  |
| +++                            | 7 (54)  |
| TIMP-2 Inhibitor               |         |
| +                              | 5 (39)  |
| ++                             | 2 (15)  |
| +++                            | 6 (46)  |

\* Only primary tumors

### *Evaluation of associations*

In the statistical analysis of clinical variables and histological prognostic factors as to MMP-2 expression, the following statistical significances were found:

*Age:* the expression of MMP-2 in epidermal tumor cells was inversely correlated with the age of the individuals. Older patients presented less expression of the enzyme ( $r_s = -0.27$ ;  $P = 0.02$ ).

*Topography:* elevated expression of the enzyme in the vessels in lesions located in the lower limbs, in relation to the lesions located in other anatomical regions ( $P < 0.01$ ).

*Histological subtype:* significance of the MMP-2 expression in the epidermal tumor cells in melanomas of the superficial spreading subtype ( $P < 0.01$ ).

*Breslow index:* significance of the correlation between the expression of MMP-2 in the dermal tumor cells and the Breslow thickness of the lesions. The higher the median Breslow index of the lesions, the higher the expression of the enzyme ( $r_s = 0.33$ ;  $P = 0.01$ ).

*Clark level:* significance in the correlation with the expression of MMP-2 in the dermal tumor cells. The higher the Clark level of the lesions, the higher the expression of the enzyme ( $r_s = 0.26$ ;  $P = 0.04$ ).

In the statistical evaluation of the same variables as to the expression of TIMP-2, the following statistical significances were found:

*Age:* the expression of TIMP-2 in the epidermal tumor cells was inversely correlated with the patients' age ( $r_s = -0.35$ ;  $P < 0.01$ ).

*Sex*: significance was found in the presence of the inhibitor in the stroma and in the female sex ( $P < 0.01$ ).

*Breslow index*: significance in the correlation between the expression of TIMP-2 in dermal tumor cells and Breslow thickness. The higher the median Breslow index of the lesions, the greater the expression of the inhibitor ( $r_s = 0.32$ ;  $P = 0.01$ ).

*Clark level*: significance in the correlation between the expression of the TIMP-2 in the epidermal cells and the Clark level. The higher the Clark of the lesions, the lower the expression of the inhibitor ( $r_s = -0.30$ ;  $P < 0.01$ ).

*Mitotic index*: significance in the expression of TIMP-2 in the dermal tumor cells. The higher the mitotic index considered, the higher the expression of the inhibitor ( $r_s = 0.32$ ;  $P = 0.02$ ).

*Surgical margins*: significance in the expression of TIMP-2 and in lesion stroma. There was a lower expression in the inhibitor in lesions with involvement of the margins ( $P = 0.05$ ).

Observing tables 2 and 3 the other relations are seen, with other possible associations, but without any demonstration of statistical significance in this study.

**Table 2.**

Table 2 – Evaluation of the association between MMP-2 expression in cutaneous melanoma and its prognostic factors (n=86).

| Variable             | Stroma                          | Vessels                         | Epidermal T cells               | Dermal T cells                  | Keratinocytes                   |
|----------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| Age                  | $r_s=0.10$<br>$P=0.38^{[1]}$    | $r_s=0.13$<br>$P=0.25^{[1]}$    | $r_s= - 0.27$<br>$P=0.02^{[1]}$ | $r_s= - 0.08$<br>$P=0.46^{[1]}$ | $r_s= - 0.22$<br>$P=0.06^{[1]}$ |
| Sex                  | $P=0.90^{[2]}$                  | $P=0.49^{[2]}$                  | $P=0.24^{[2]}$                  | $P=0.38^{[2]}$                  | $P=0.61^{[2]}$                  |
| Topography           | $P=0.08^{[3]}$                  | $P<0.01^{[3]}$                  | $P=0.87^{[3]}$                  | $P=0.40^{[3]}$                  | $P=0.14^{[3]}$                  |
| Histological subtype | $P=0.42^{[3]}$                  | $P=0.11^{[3]}$                  | $P<0.01^{[3]}$                  | $P=0.47^{[3]}$                  | $P=0.11^{[3]}$                  |
| Breslow              | $r_s=0.06$<br>$P=0.65^{[1]}$    | $r_s=0.21$<br>$P=0.11^{[1]}$    | $r_s= - 0.16$<br>$P=0.22^{[1]}$ | $r_s=0.33$<br>$P=0.01^{[1]}$    | $r_s= - 0.07$<br>$P=0.58^{[1]}$ |
| Ulceration           | $P=0.60^{[4]}$                  | $P=0.86^{[4]}$                  | $P=0.10^{[4]}$                  | $P=0.34^{[4]}$                  | $P=0.77^{[4]}$                  |
| Regression           | $P=0.51^{[4]}$                  | $P=0.39^{[4]}$                  | $P=0.99^{[4]}$                  | $P=0.12^{[4]}$                  | $P=0.79^{[4]}$                  |
| Clark                | $r_s=0.08$<br>$P=0.50^{[1]}$    | $r_s=0.22$<br>$P=0.07^{[1]}$    | $r_s= - 0.10$<br>$P=0.41^{[1]}$ | $r_s=0.26$<br>$P=0.04^{[1]}$    | $r_s=0.02$<br>$P=0.88^{[1]}$    |
| Mitotic index        | $r_s=0.11$<br>$P=0.40^{[1]}$    | $r_s=0.19$<br>$P=0.16^{[1]}$    | $r_s= - 0.20$<br>$P=0.13^{[1]}$ | $r_s=0.16$<br>$P=0.22^{[1]}$    | $r_s= - 0.02$<br>$P=0.89^{[1]}$ |
| Growth phase         | $P=0.73^{[2]}$                  | $P=0.13^{[2]}$                  | $P=0.78^{[2]}$                  | $P=0.06^{[2]}$                  | $P=0.76^{[2]}$                  |
| PTLII                | $r_s= - 0.18$<br>$P=0.18^{[1]}$ | $r_s= - 0.06$<br>$P=0.66^{[1]}$ | $r_s= - 0.05$<br>$P=0.72^{[1]}$ | $r_s= - 0.05$<br>$P=0.72^{[1]}$ | $r_s= - 0.06$<br>$P=0.66^{[1]}$ |
| IIIT                 | $r_s= - 0.03$<br>$P=0.80^{[1]}$ | $r_s= - 0.10$<br>$P=0.47^{[1]}$ | $r_s=0.06$<br>$P=0.67^{[1]}$    | $r_s=0.23$<br>$P=0.08^{[1]}$    | $r_s=0.07$<br>$P=0.58^{[1]}$    |
| Surgical margin      | $P=0.50^{[2]}$                  | $P=0.82^{[2]}$                  | $P=0.34^{[2]}$                  | $P=0.89^{[2]}$                  | $P=0.18^{[2]}$                  |
| Metastases           | $P=0.48^{[2]}$                  | $P=0.66^{[2]}$                  | —                               | $P=0.66^{[2]}$                  | —                               |

Epidermal T cells: epidermal tumoral cells; Dermal T cells: dermal tumoral cells. PTLII: peritumoral lymphocytic inflammatory infiltrate; IIIT: intratumoral inflammatory infiltrate. P: statistical significance;  $r_s$ : Spearman correlation coefficient; [1]: Student t for a significance of  $r_s$ ; [2] Mann-Whitney U test; [3] Kruskal – Wallis H test; [4] Chi-square test with a linear tendency.

**Table 3.**

Table 3 – Evaluation of association between TIMP-2 expression in cutaneous melanoma and its prognostic factors (n=86).

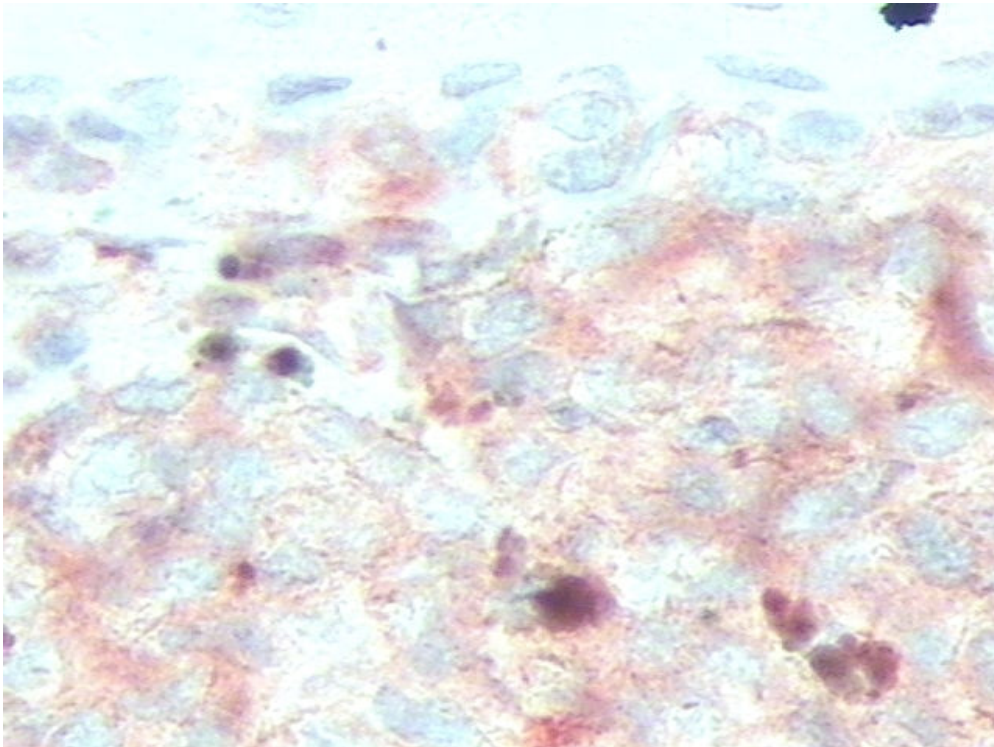
| Variable             | Stroma                                 | Vessels                                | Epidermal T cells                      | Dermal T cells                         | Keratynocytes                          |
|----------------------|----------------------------------------|----------------------------------------|----------------------------------------|----------------------------------------|----------------------------------------|
| Age                  | $r_s = -0.14$<br>P=0.21 <sup>[1]</sup> | $r_s = -0.2$<br>P=0.87 <sup>[1]</sup>  | $r_s = -0.35$<br>P<0.01 <sup>[1]</sup> | $r_s = -0.8$<br>P=0.49 <sup>[1]</sup>  | $r_s = -0.08$<br>P=0.52 <sup>[1]</sup> |
| Sex                  | P<0.01 <sup>[2]</sup>                  | P=0.32 <sup>[2]</sup>                  | P=0.29 <sup>[2]</sup>                  | P=0.26 <sup>[2]</sup>                  | P=0.44 <sup>[2]</sup>                  |
| Topography           | P=0.91 <sup>[3]</sup>                  | P=0.98 <sup>[3]</sup>                  | P=0.25 <sup>[3]</sup>                  | P=0.36 <sup>[3]</sup>                  | P=0.73 <sup>[3]</sup>                  |
| Histological subtype | P=0.97 <sup>[3]</sup>                  | P=0.87 <sup>[3]</sup>                  | P=0.10 <sup>[3]</sup>                  | P=0.46 <sup>[3]</sup>                  | P=0.63 <sup>[3]</sup>                  |
| Breslow              | $r_s = -0.12$<br>P=0.37 <sup>[1]</sup> | $r_s = -0.15$<br>P=0.27 <sup>[1]</sup> | $r_s = -0.15$<br>P=0.27 <sup>[1]</sup> | $r_s = 0.32$<br>P=0.01 <sup>[1]</sup>  | $r_s = -0.01$<br>P=0.97 <sup>[1]</sup> |
| Ulceration           | P=0.85 <sup>[4]</sup>                  | P=0.23 <sup>[4]</sup>                  | P=0.87 <sup>[4]</sup>                  | P=0.08 <sup>[4]</sup>                  | P=0.99 <sup>[4]</sup>                  |
| Regression           | P=0.86 <sup>[4]</sup>                  | P=0.99 <sup>[4]</sup>                  | P=0.65 <sup>[4]</sup>                  | P=0.71 <sup>[4]</sup>                  | P=0.38 <sup>[4]</sup>                  |
| Clark                | $r_s = -0.08$<br>P=0.49 <sup>[1]</sup> | $r_s = -0.05$<br>P=0.70 <sup>[1]</sup> | $r_s = -0.30$<br>P<0.01 <sup>[1]</sup> | $r_s = 0.20$<br>P=0.12 <sup>[1]</sup>  | $r_s = -0.21$<br>P=0.08 <sup>[1]</sup> |
| Mitotic index        | $r_s = -0.03$<br>P=0.85 <sup>[1]</sup> | $r_s = -0.08$<br>P=0.56 <sup>[1]</sup> | $r_s = -0.12$<br>P=0.37 <sup>[1]</sup> | $r_s = 0.32$<br>P=0.02 <sup>[1]</sup>  | $r_s = -0.09$<br>P=0.52 <sup>[1]</sup> |
| Growth phase         | P=0.14 <sup>[2]</sup>                  | P=0.55 <sup>[2]</sup>                  | P=0.21 <sup>[2]</sup>                  | P=0.08 <sup>[2]</sup>                  | P=0.10 <sup>[2]</sup>                  |
| PTLII                | $r_s = -0.01$<br>P=0.97 <sup>[1]</sup> | $r_s = 0.04$<br>P=0.78 <sup>[1]</sup>  | $r_s = 0.06$<br>P=0.63 <sup>[1]</sup>  | $r_s = -0.10$<br>P=0.44 <sup>[1]</sup> | $r_s = -0.09$<br>P=0.49 <sup>[1]</sup> |
| IIIT                 | $r_s = 0.03$<br>P=0.80 <sup>[1]</sup>  | $r_s = -0.04$<br>P=0.77 <sup>[1]</sup> | $r_s = -0.04$<br>P=0.79 <sup>[1]</sup> | $r_s = 0.04$<br>P=0.76 <sup>[1]</sup>  | $r_s = -0.13$<br>P=0.32 <sup>[1]</sup> |
| Surgical margin      | P=0.05 <sup>[2]</sup>                  | P=0.69 <sup>[2]</sup>                  | P=0.43 <sup>[2]</sup>                  | P=0.71 <sup>[2]</sup>                  | P=0.84 <sup>[2]</sup>                  |
| Metastases           | P=0.57 <sup>[2]</sup>                  | P=0.49 <sup>[2]</sup>                  | —                                      | P=0.31 <sup>[2]</sup>                  | —                                      |

Epidermal T cells: epidermal tumoral cells; Dermal T cells: dermal tumoral cells. PTLII: peritumoral lymphocytic inflammatory infiltrate; IIIT: intratumoral inflammatory infiltrate. P: statistical significance;  $r_s$ : Spearman correlation coefficient; [1]: Student t for a significance of  $r_s$ ; [2] Mann-Whitney U test; [3] Kruskal – Wallis H test; [4] Chi-square test with a linear tendency.

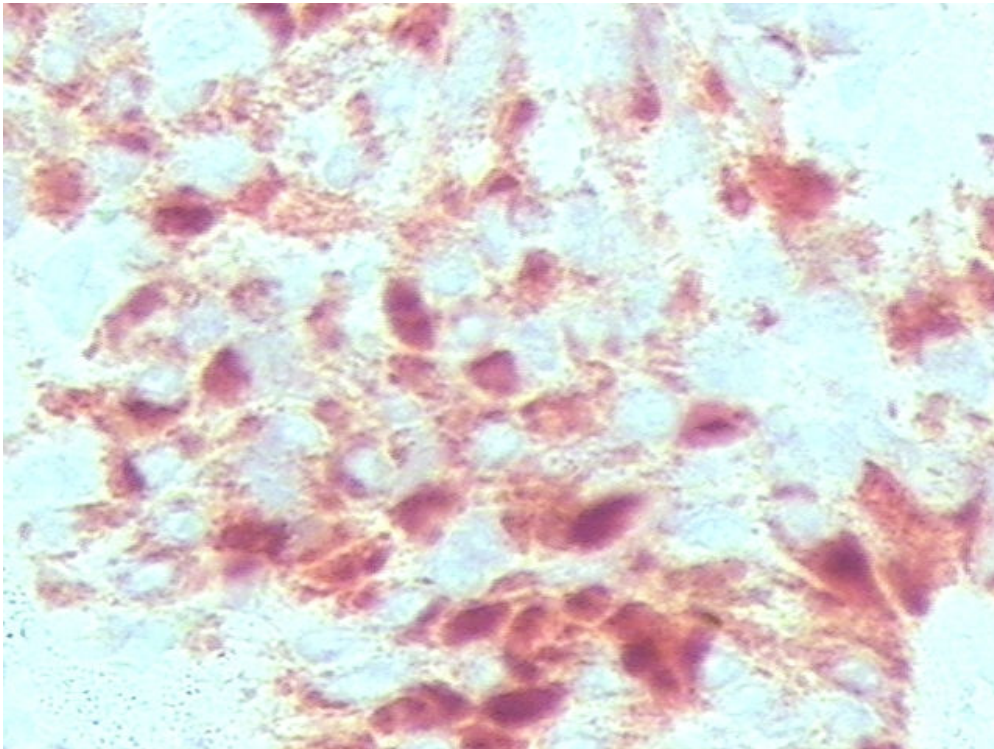
*The variables lymphatic and blood vessel invasion, perineural invasion and microscopic satellitosis could not be analyzed due to the very low frequency of events observed.*



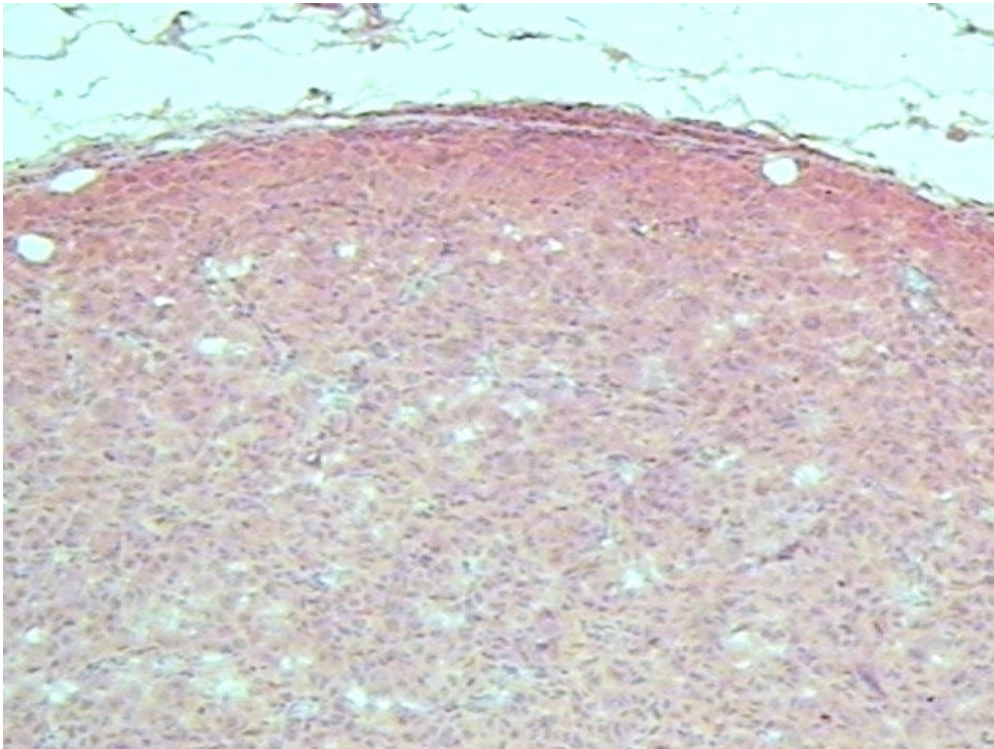
**Photographs showing the immunohistochemical expression of MMP-2 and of TIMP-2 in cases of primary melanoma and cutaneous metastases are shown in figures 1, 2 and 3.**



**Figure 1 – Expression of MMP-2 in the superficial spreading type melanoma: stroma 3+ (immunoperoxidase – AEC, 400 x, in the original).**



**Figure 2 – Expression of TIMP-2 in the superficial spreading type melanoma: epidermal tumor cells 2+ (immunoperoxidase – AEC, 400 x, in the original).**



**Figure 3 – Expression of MMP-2 in cutaneous metastasis of melanoma: stroma 1+; vessels 3+; dermal tumor cells 3+ (immunoperoxidase – AEC, 50 x, in the original).**

## Discussion

In 1996, Väisänen et cols showed an increased expression of MMP-2 in cutaneous melanoma, correlating it with a disorder of dermal architecture with atypia of melanocytic lesions and with hematogenic metastases [20].

In another study there was an association between the increased expression of MMP-2 and an unfavorable prognosis for melanoma patients. The correlation between an increased MMP-2 expression and a lower rate of survival was actually a factor independent of the Breslow index and the Clark level [21].

And, more recently, Väisänen et cols provided evidence that MMP-2 can be recognized as a new prognostic marker in melanoma patients [19].

A sample description of the present study showed that most (63%) of the diagnoses of primary cutaneous melanoma were made at a stage when the Breslow level is considered thin (maximum thickness, 1mm), in which the growth phase is still very important.

The expression of MMP-2 and TIMP-2 occurred in all cases of primary cutaneous melanoma and in all cases of cutaneous metastases. Following the semi-quantitative analysis used, the maximum positivity index (3+) for MMP-2 expression was observed in most of the patients, and for the expression of TIMP-2, in a major parcel of the cases (table 1).

Despite this general profile, and showing that even in thin melanomas the presences of MMP-2 and its inhibitor is constant, there were variabilities as to the expression of MMP-2 and TIMP-2, regarding the histopathological prognostic factors.

In this study it is important to verify that the presence of MMP-2 was associated mainly with younger patients (with expression in epidermal tumor cells, and in association at the limit for significance, with expression in keratinocytes, according to table 2), with melanoma on the lower limbs (with expression in the dermal vessels), with melanomas of the superficial spreading type (with expression in the epidermal tumor cells); more particularly also in the thicker ones (with expression in the dermal tumor cells in a positive correlation for the Breslow index and Clark level).

These data may favor a possible hypothesis regarding the action of ultraviolet radiation to induce MMP-2 secretion by epidermal cells (melanocytes and keratinocytes) in patients who are constitutionally predisposed to cutaneous melanoma, as one of the important factors in its genesis.

The epidermal cells secrete MMPs induced by ultraviolet radiation and it is recognized that the genesis of the melanoma of the superficial spreading subtype is related to exposure to the sun in many patients [14, 22]. In a previous study it had already been demonstrated that acute exposure to ultraviolet radiation raises MMP-2 expression in melanocytes of nevi [23].

*The absence of a specific association with one of the growth phases (horizontal and vertical), shows that MMP-2 must participate in the development of the cutaneous melanoma from the beginning (horizontal growth) and not only in the more invasive phase (vertical growth).*

The immunohistochemical expression of TIMP-2 accompanies that of MMP-2 in the inverse correlation with age (the younger melanocytes may be more reactive and secrete more enzyme and its inhibitor and/or the young ones really

are more exposed to ultraviolet radiation, acutely) and in association with the indices of Breslow and Clark.

This expression of TIMP-2 can be considered logical since, when large amounts of MMP-2 are produced, there is a natural induction of higher secretion of its blocker. Paradoxically, TIMP-2 can also simulate the additional secretion of MMP-2. Larger amounts of this enzyme, then, would no longer be inhibited, and its action would be facilitated. In this sense, Yoshino et cols showed a significant correlation between high levels of TIMP-2 and tumor progression in melanoma patients [24].

In this study, TIMP-2 was associated with a higher mitotic index, a histopathological prognostic factor currently tending to being considered more valuable. The mitotic index did not show a statistically significant correlation with the expression of MMP-2, but a borderline correlation is found (which might be the result of a sampling that is smaller than necessary to demonstrate this association).

The lower expression of TIMP-2 associated with compromised surgical margins and their higher expression in the female sex should be attributed to chance in the light of current knowledge.

The presence of MMP-2 in all 13 cases of cutaneous metastases of melanoma also shows that the tumor cells continue to secrete MMP-2 at other sites. Possibly MMP-2 participates in enabling metastatic implants in different tissues, through its angiogenic, pro-mitotic and collagenolytic actions.

## **5. Conclusions**

In this study MMP-2 had higher expression in young patients, in lower limbs melanomas and in superficial spreading melanomas.

MMP-2 is an enzyme that can participate in initial and invasive phases of primary cutaneous melanoma development, and it is related to important histopathological factors, besides being present in the cutaneous metastases of melanoma. The immunohistochemical expression of its natural inhibitor, TIMP-2 is similar to MMP-2 in primary melanoma and cutaneous metastases.

## **6. Acknowledgments**

This paper was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES – Brazil. The authors thank Mrs Rosalva Tereza Meurer, Prof. Dr. Maria Isabel Albano Edelweiss and Prof. Dr. Mário Bernardes Wagner for their invaluable help.

## References

1. Venegas, L.F.P., et al., *Melanoma Maligno cutâneo no Rio Grande do Sul*. Rev Ass Med Brasil, 1992. 38(3): p. 122-6.
2. Bakos, L., et al., *Sunburn, sunscreens, and phenotypes: some risk factors for cutaneous melanoma in southern Brazil*. International Journal of Dermatology, 2002. 41: p. 557-562.
3. Azevedo, G. and S. Mendonça, *Risco crescente de melanoma de pele no Brasil*. Revista de Saúde Pública, 1992. 26(4): p. 290-294.
4. Flórez, Á. and M. Cruces, *Melanoma epidemic: True or false?* International Journal of Dermatology, 2004. 43: p. 405-407.
5. Marks, R., *Epidemiology of melanoma*. Clinical and Experimental Dermatology, 2000. 25: p. 459-463.
6. Thompson, J.F., R.A. Scolyer, and R.F. Kefford, *Cutaneous Melanoma*. The Lancet, 2005. 365: p. 687-701.
7. Cummins, D.L., et al., *Cutaneous Malignant Melanoma*. Mayo Clin Proc, 2006. 81(4): p. 500-507.
8. Miller, A.J. and M. Mihm Jr, *Melanoma*. The New England Journal of Medicine, 2006. 355: p. 51-65.
9. Landman, G. and etal, *Consenso para o laudo anatomopatológico do melanoma cutâneo: Grupo Multicêntrico e Multidisciplinar Brasileiro para Estudo do Melanoma (GBM)*. Acta Oncológica Brasileira, 2003. 23(10).



10. Visse, R. and H. Nagase, *Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors os Metalloproteinases*. *Circulation Research*, 2003. 92: p. 827-839.
11. Clark, I.M., et al., *The regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors*. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2008. 40: p. 1362-1378.
12. Konstantinopoulos, P.A., et al., *Matrix metalloproteinase inhibitors as anticancer agents*. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2008. 40: p. 1156-1168.
13. Seltzer, J. and A. Eisen, *O Papel das Metaloproteinases da Matriz na Remodelação do Tecido Conjuntivo*, in *Dermatologia*, Fitzpatrick, Editor. 2003.
14. Fisher, G.J., et al., *Pathophysiology of Premature Skin Aging Induced by Ultraviolet Light*. *The New England Journal of Medicine*, 1997. 337(20): p. 1419-1428.
15. Chang, C. and Z. Werb, *The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis*. *TRENDS in Cell Biology*, 2001. 11(11): p. S37.
16. Hofmann, U.B., et al., *Matrix Metalloproteinases in Human Melanoma*. *The Journal of Investigative Dermatology*, 2000. 115: p. 337-344.
17. Redondo, P., et al., *Expression and serum levels of MMP-2 and MMP-9 during human melanoma progression*. *Clinical and Experimental Dermatology*, 2005. 30: p. 541-545.

18. Hsu, S.M., L. Raine, and H. Fanger, *The use of antiavidin antibody and avidin-biotin-peroxidase complex in immunoperoxidase technics*. *Am J Clin Pathology*, 1981. 75(6): p. 816-21.
19. Vaisanen, A.H., M. Kallioinen, and T. Turpeenniemi-Hujanen, *Comparison of the prognostic value of matrix metalloproteinases 2 and 9 in cutaneous melanoma*. *Human Pathology*, 2008. 39: p. 377-385.
20. Vaisanen, A., et al., *Matrix Metalloproteinase-2 (72 kD Type IV Collagenase) expression occurs in the early stage of human melanocytic tumor progression and may have prognostic value*. *Journal of Pathology*, 1996. 180: p. 283-289.
21. Vaisanen, A., et al., *Prognostic value of MMP-2 immunoreactive protein (72 kD type IV collagenase) in primary skin melanoma*. *Journal of Pathology*, 1998. 186: p. 51-58.
22. Markovic, S.N., et al., *Malignant Melanoma in the 21st Century, Part 1: Epidemiology, Risk Factors, Screening, Prevention, and Diagnosis*. *Mayo Clin Proc*, 2007. 82(3): p. 364-380.
23. Bakos, R.M., et al., *Immunohistochemical expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 in melanocytic nevi is altered by ultraviolet B*. *Photodermatology Photoimmunology & Photomedicine*, 2007. 23: p. 250-254.
24. Yoshino, Y., et al., *Clinical relevance of serum levels of matrix metalloproteinase-2, and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and -2 in patients with malignant melanoma*. *Journal of Dermatology*, 2008. 35: p. 206-214.

### **6.1. Artigo científico redigido em português**

## **7. MMP-2 e TIMP-2 no melanoma cutâneo: associação com os fatores prognósticos e descrição nas metástases cutâneas**

**Autores:** Maria Carolina Widholzer Rey<sup>1</sup>, Renan Rangel Bonamigo<sup>2</sup>, André Cartell<sup>3</sup>, Roque Furian<sup>4</sup>, Raquel Bonfá<sup>5</sup>, Rafael Bonfá<sup>6</sup>

**Instituição:** Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA) – Brasil e Serviço de Patologia do Complexo Hospitalar Santa Casa de Porto Alegre – Brasil.

**1 – Dermatologista, aluna do Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), POA, RS, Brasil. 2 – Professor do Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), POA, RS, Brasil. 3 – Professor de Patologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), POA, RS, Brasil. 4 - Professor de Patologia da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), POA, RS, Brasil. 5 – Estudante de medicina da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), POA, RS, Brasil. 6 – Médico Dermatologista, POA, RS, Brasil.**

**Palavras-chave:** melanoma, metaloproteinases da matriz, gelatinases, prognóstico, metástases.

**Conflito de interesses:** nenhum.

**Suporte financeiro:** bolsa da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES – Brasil.

**Endereço para correspondência:** Rua Gregor Mendel 90, POA/RS – Brasil. CEP 90480-150. E-mail: caro2rey@yahoo.com.br

8. Artigo a ser submetido ao *Journal of Cutaneous Pathology*.

## 9. Resumo

**Introdução:** metaloproteinase-2 da matriz (MMP-2) está expressa nos melanomas cutâneos espessos, mas há escassez de informações sobre as relações entre esta gelatinase com aspectos clínicos e o conjunto dos demais fatores prognósticos histopatológicos. São escassos os relatos sobre sua expressão nas metástases cutâneas de melanoma.

**Métodos:** foram avaliados, transversalmente, casos de melanomas cutâneos primários e metástases cutâneas de melanoma, quanto às expressões imuno-histoquímicas da MMP-2 e do seu inibidor tecidual (TIMP-2). Associações com aspectos clínicos e com os fatores prognósticos histopatológicos foram verificadas. Consideraram-se estatisticamente significantes as associações com  $P < 0,05$ .

**Resultados:** estudados 73 casos de melanomas cutâneos primários e 13 de metástases cutâneas. Houve associação entre a expressão da MMP-2 e idades menores, localização em membros inferiores, subtipo espalhamento superficial, índice de Breslow e nível de Clark elevados. A expressão do TIMP-2 foi semelhante. Não houve associação exclusiva da MMP-2 e TIMP-2 com uma das fases de crescimento do melanoma cutâneo primário. Todos os casos de metástases expressaram MMP-2 e TIMP-2.

**Conclusões:** MMP-2 pode participar de fases iniciais do crescimento do melanoma, mas está particularmente presente nos melanomas invasivos. Sua maior expressão é principalmente verificada no subtipo espalhamento superficial e em pacientes mais jovens. As metástases cutâneas sempre expressam a enzima. O TIMP-2 possui uma expressão imuno-histoquímica semelhante a da MMP-2.

## Introdução

A incidência do melanoma vem crescendo em várias regiões do mundo, sendo este considerado um grande problema em Saúde Pública [1-7]. Embora represente apenas 4% de todas as neoplasias malignas da pele, ele é responsável por 80% das mortes por cânceres cutâneos [8].

O melanoma cutâneo apresenta-se com maior frequência em populações caucasianas e há nítidas evidências de que indivíduos de pele clara possuem maior predisposição para o seu desenvolvimento [3, 4]. Diversos estudos demonstraram que a exposição à radiação ultravioleta (RUV) é o principal fator de risco ambiental para o desenvolvimento do melanoma [5, 7].

A espessura tumoral, representada pelo índice de Breslow, é considerada o principal fator prognóstico histopatológico da neoplasia [4]. Em 2003, uma diretriz do Grupo Multicêntrico e Multidisciplinar Brasileiro para Estudo do Melanoma (GBM) recomendou que o laudo anatomopatológico do melanoma contivesse, além da espessura tumoral, os seguintes parâmetros, os quais também serviriam como fatores prognósticos: subtipo histológico, ulceração, fase de crescimento (se radial ou vertical), nível de Clark, índice mitótico, infiltrado inflamatório linfocitário peritumoral, infiltrado inflamatório intratumoral, invasão vascular linfática e sanguínea, invasão perineural, regressão, satelitose microscópica e margens cirúrgicas [9].

Uma série variada de mediadores biológicos possuem ações patogênicas no desenvolvimento do melanoma e exercem os efeitos que influenciam os fatores histopatológicos de prognóstico. Entre estes mediadores estão as enzimas



metaloproteinases da matriz (MMPs), originalmente descritas com uma ação predominante na homeostase da matriz extracelular, através da clivagem de substratos componentes desta matriz [10, 11].

Entre as MMPs que contribuem para a progressão tumoral, encontra-se a metaloproteinase-2 da matriz (MMP-2), a qual tem a habilidade de degradar o colágeno tipo IV, promover a angiogênese e a mitogênese. Já foi descrita a elevação da atividade desta enzima em diversas malignidades humanas [12].

A MMP-2 é produzida principalmente a partir de células mesenquimais (fibroblastos), ainda que queratinócitos, melanócitos, células endoteliais, macrófagos e neutrófilos possam produzi-la [13].

As radiações ultravioletas A (UVA) e B (UVB) são indutoras da secreção e da ação da MMP-2 [14].

Uma família com quatro inibidores específicos das MMPs, conhecidos como inibidores teciduais das metaloproteinases (TIMPs), participam do controle da atividade das MMPs [10, 11]. Os TIMPS inibem seletivamente e reversivelmente as MMPs e o inibidor tecidual da metaloproteinase-2 (TIMP-2) regula a ativação da MMP-2 [15, 16].

Reconhecidamente, a MMP-2 está associada aos maiores índices de Breslow, e à progressão do melanoma; mas não são encontrados estudos que relacionem a MMP-2 com os demais fatores histopatológicos de prognóstico. A presença do TIMP-2 em associação com o conjunto completo destes fatores também não foi estudada [17].

O reconhecimento da participação destes mediadores na configuração do perfil histopatológico de prognóstico do melanoma pode ser importante para uma

melhor compreensão do comportamento evolutivo deste e auxiliar na definição sobre as opções terapêuticas bloqueadoras da ação da MMP-2.

O presente estudo avaliou a expressão imuno-histoquímica da MMP-2 e do TIMP-2 no melanoma cutâneo, particularmente quanto às suas relações com os fatores prognósticos histopatológicos. Também nas metástases cutâneas de melanoma as expressões da MMP-2 e do TIMP-2 foram avaliadas.

## 10. Material e Métodos

A pesquisa foi aprovada pelos Comitês de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre – UFCSPA e do Complexo Hospitalar da Santa Casa de Porto Alegre – CHSC.

Foi realizado um estudo transversal com os casos de melanoma cutâneo primário e metástases cutâneas de melanoma, oriundos dos Serviços de Cirurgia e Patologia do Hospital Santa Rita (Complexo Hospitalar Santa Casa, Porto Alegre – Brasil), entre 2003 e 2005.

As variáveis avaliadas no estudo foram idade, sexo, topografia da lesão, subtipo histológico do melanoma, fatores histopatológicos recomendados pelo GBM, metástases cutâneas e a expressão imuno-histoquímica da MMP-2 e do TIMP-2 nos melanomas cutâneos primários e nas metástases cutâneas de melanoma.

### *Histopatologia*

Os espécimes foram fixados em formalina e incluídos em parafina. As lâminas foram coradas com hematoxilina-eosina (HE) e avaliadas para a confirmação do melanoma na biópsia excisional e para a verificação da presença dos fatores prognósticos do GBM. Os casos de metástases cutâneas foram confirmados por nova avaliação histopatológica. Após, o material foi encaminhado para a realização da imuno-histoquímica para a MMP-2 e para o TIMP-2.

### *Técnica Imuno-histoquímica*

A técnica tradicional de imunoperoxidase com avidina-biotina foi utilizada [18]. Foram empregados anticorpos monoclonais comerciais para MMP-2 (Novocastra<sup>®</sup> Laboratories, Newcastle upon Tyne, United Kingdom) e TIMP-2 (Novocastra<sup>®</sup> Laboratories, Newcastle upon Tyne, United Kingdom). Para a visualização do complexo antígeno-anticorpo foram aplicadas as seguintes soluções cromógenas: diaminobenzidina (DAB) e 3-Amino-9-etil carbazole (AEC) contracolorados com Giemsa.

#### **10.1. Avaliação da Imuno-histoquímica para MMP-2 e TIMP-2**

As lâminas foram examinadas em microscópio óptico por um dermatopatologista experiente (A.C.) na avaliação de lâminas de imuno-histoquímica para o estudo de metaloproteinases.

Para analisar as expressões da MMP-2 e do TIMP-2 foi utilizado o método semi-quantitativo, em que: 0 significava ausência de expressão; 1+ expressão fraca; 2+ expressão moderada e 3+ expressão forte.

Nos melanomas primários as expressões da MMP-2 e do TIMP-2 foram avaliadas no estroma, nos vasos, nas células tumorais epidérmicas, nas células tumorais dérmicas e nos queratinócitos. Nas metástases foram avaliadas as

células tumorais e o estroma. As lâminas foram analisadas separadamente com os cromógenos DAB e AEC, mas para fins de homogeneização do estudo, optou-se pela leitura das lâminas coradas com AEC, a qual facilitou a diferenciação da coloração que decorre da reação química antígeno-anticorpo com a melanina. Tal técnica, para este fim, está descrita na literatura [17, 19].

#### *Análise estatística*

**Foram utilizados o coeficiente de correlação de Spearman e o teste de significância t de Student para avaliação da idade, da espessura de Breslow, do nível de Clark, do índice mitótico, do infiltrado inflamatório linfocitário peritumoral e do infiltrado inflamatório intratumoral; o teste U de Mann-Whitney para o sexo, a fase de crescimento, as margens cirúrgicas e as metástases; o teste H de Kruskal-Wallis para a topografia da lesão e o subtipo histológico; o teste de qui-quadrado de tendência linear para a ulceração e a regressão.**

**Utilizou-se um nível de 5% ( $P < 0,05$ ) para considerar a relevância estatística. Os dados foram analisados empregando-se o programa estatístico SPSS 15.0.**

## Resultados

### 10.2. Descrição geral

Em um total de 86 casos avaliados, 73 corresponderam a melanomas cutâneos primários e 13 a metástases cutâneas de melanoma.

A idade média geral dos pacientes foi de 56,9 anos, 49 (57%) femininos e 37 (43%) masculinos. Os pacientes com melanoma primário apresentaram idade média de 54,97 anos, 44 eram mulheres e 29 eram homens. Nos casos de metástases cutâneas, a idade média foi de 62,46 anos, 5 eram mulheres e 8 eram homens.

Em relação às lesões primárias, sua distribuição topográfica correspondeu a 24 (33%) casos localizados no dorso; 17 (23%) nos membros inferiores; 17 (23%) na região de cabeça e pescoço; 9 (12%) nos membros superiores e 6 (8%) na área correspondendo ao tórax anterior e abdômen.

Nestas lesões primárias, observou-se a seguinte distribuição, segundo o subtipo histológico: 50 (69%) casos de melanoma tipo espalhamento superficial; 11 (15%) tipo lentigo maligno; 8 (11%) tipo nodular e 4 (6%) tipo acral.

A profundidade destes tumores foi avaliada pelo índice de Breslow, que assim distribuiu-se: 14 (19%) lesões eram *in situ*; 32 (44%) apresentavam Breslow menor ou igual a 1,0 mm; 10 (10%) eram maiores do que 1,0 mm e menores ou iguais a 2,0 mm; 3 (4%) eram maiores do que 2,0 mm e menores ou iguais a 4,0 mm e 14 (19%) das lesões apresentavam Breslow maior do que 4,0 mm.

Todas as lâminas de melanoma cutâneo primário e de metástases cutâneas de melanoma expressaram a enzima e o seu inibidor.

Quanto à expressão da MMP-2 no melanoma cutâneo primário, 6 casos (8%) apresentaram 1+; 19 (26%), 2+; e 48 (66%), 3+. Na avaliação da expressão do TIMP-2, no melanoma cutâneo primário, 16 casos (22%) apresentaram 1+; 26 (36%), 2+; e 31 (43%), 3+.

As metástases apresentaram, quanto à expressão da MMP-2, em 4 casos (31%), 1+; em 2 (15%), 2+; e em 7 (54%), 3+. Quanto à expressão do TIMP-2 nas metástases, 5 casos (39%) apresentaram 1+; 2 (15%), 2+; e 6 (46%), 3+.

**A tabela 1 demonstra os resultados descritos acima.**

Tabela 1.

Tabela 1 – Características gerais dos pacientes e dos melanomas (n=86)

| Variável                 | n = 86    |
|--------------------------|-----------|
| Idade, média±DP (anos)   | 56,9±14,9 |
| Sexo feminino, n° (%)    | 49 (57)   |
| Tipo de lesão, n° (%)    |           |
| Tumor primário           | 73 (85)   |
| Metástase                | 13 (15)   |
| Topografia*, n° (%)      | n = 73    |
| Dorso                    | 24 (33)   |
| Membro inferior          | 17 (23)   |
| Cabeça e pescoço         | 17 (23)   |
| Membro superior          | 9 (12)    |
| Tórax anterior e abdômen | 6 (8)     |
| Subtipo histológico*     | n = 73    |

|                              |         |
|------------------------------|---------|
| Espalhamento superficial     | 50 (69) |
| Lentigo maligno              | 11 (15) |
| Nodular                      | 8 (11)  |
| Acral                        | 4 (6)   |
| Espessura de Breslow         | n = 73  |
| <i>in situ</i>               | 14 (19) |
| ≤ 1,0 mm                     | 32 (44) |
| > 1,0 mm - ≤ 2,0 mm          | 10 (10) |
| > 2,0 mm - ≤ 4,0 mm          | 3 (4)   |
| > 4,0 mm                     | 14 (19) |
| Expressão imuno-histoquímica |         |
| Tumor primário               | n = 73  |
| Metaloproteinase-2           |         |
| +                            | 6 (8)   |
| ++                           | 19 (26) |
| +++                          | 48 (66) |
| Inibidor – TIMP-2            |         |
| +                            | 16 (22) |
| ++                           | 26 (36) |
| +++                          | 31 (43) |
| Metástases                   | n = 13  |
| Metaloproteinase-2           |         |
| +                            | 4 (31)  |
| ++                           | 2 (15)  |
| +++                          | 7 (54)  |
| Inibidor – TIMP-2            |         |
| +                            | 5 (39)  |
| ++                           | 2 (15)  |
| +++                          | 6 (46)  |

\* Somente tumores primários



### *Avaliação das associações*

Na análise estatística das variáveis clínicas e dos fatores prognósticos histopatológicos quanto à expressão da MMP-2, foram encontradas as seguintes significâncias estatísticas:

*Idade:* a expressão da MMP-2 nas células tumorais epidérmicas correlacionou-se inversamente com a idade dos indivíduos. Pacientes com maior idade apresentaram menor expressão da enzima ( $r_s = -0,27$ ;  $P = 0,02$ ).

*Topografia:* expressão elevada da enzima nos vasos em lesões localizadas nos membros inferiores, em relação às lesões localizadas em outras regiões anatômicas ( $P < 0,01$ ).

*Subtipo histológico:* significância da expressão da MMP-2 nas células tumorais epidérmicas nos melanomas do subtipo espalhamento superficial ( $P < 0,01$ ).

*Índice de Breslow:* significância na correlação entre a expressão da MMP-2 nas células tumorais dérmicas e a espessura de Breslow das lesões. Quanto maior o índice de Breslow mediano das lesões, maior a expressão da enzima ( $r_s = 0,33$ ;  $P = 0,01$ ).

*Nível de Clark:* significância na correlação com a expressão da MMP-2 nas células tumorais dérmicas. Quanto maior o nível de Clark das lesões, maior a expressão da enzima ( $r_s = 0,26$ ;  $P = 0,04$ ).

Na avaliação estatística das mesmas variáveis quanto à expressão do TIMP-2, foram encontradas as seguintes significâncias estatísticas:

*Idade*: a expressão do TIMP-2 nas células tumorais epidérmicas apresentou-se inversamente correlacionada à idade dos pacientes ( $r_s = -0,35$ ;  $P < 0,01$ ).

*Sexo*: encontrou-se significância na presença do inibidor no estroma e o sexo feminino ( $P < 0,01$ ).

*Índice de Breslow*: significância na correlação entre a expressão do TIMP-2 nas células tumorais dérmicas e a espessura de Breslow . Quanto maior o índice de Breslow mediano das lesões, maior a expressão do inibidor ( $r_s = 0,32$ ;  $P = 0,01$ ).

*Nível de Clark*: significância na correlação entre a expressão do TIMP-2 nas células tumorais epidérmicas e o nível de Clark. Quanto maior o Clark das lesões, menor a expressão do inibidor ( $r_s = -0,30$ ;  $P < 0,01$ ).

*Índice mitótico*: significância na expressão no TIMP-2 nas células tumorais dérmicas. Quanto maior o índice mitótico considerado, maior a expressão do inibidor ( $r_s = 0,32$ ;  $P = 0,02$ ).

*Margens cirúrgicas*: significância na expressão do TIMP-2 e no estroma das lesões. Houve uma menor expressão no inibidor em lesões com margens comprometidas ( $P = 0,05$ ).

Observando-se as tabelas 2 e 3, são verificadas as demais relações, com outras possíveis associações, porém, sem demonstração de significância estatística neste estudo.

**Tabela 2.**

Tabela 2 – Avaliação da associação entre a expressão da MMP-2 no melanoma cutâneo e seus fatores prognósticos (n=86).

| Variável            | Estroma                         | Vasos                               | Células T. Epidérmicas                                              | Células T. Dérmicas                                              | Queratinócitos                  |
|---------------------|---------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|---------------------------------|
| Idade               | $r_s=0,10$<br>$P=0,38^{[1]}$    | $r_s=0,13$<br>$P=0,25^{[1]}$        | <b><math>r_s= - 0,27</math></b><br><b><math>P=0,02^{[1]}</math></b> | $r_s= - 0,08$<br>$P=0,46^{[1]}$                                  | $r_s= - 0,22$<br>$P=0,06^{[1]}$ |
| Sexo                | $P=0,90^{[2]}$                  | $P=0,49^{[2]}$                      | $P=0,24^{[2]}$                                                      | $P=0,38^{[2]}$                                                   | $P=0,61^{[2]}$                  |
| Topografia          | $P=0,08^{[3]}$                  | <b><math>P&lt;0,01^{[3]}</math></b> | $P=0,87^{[3]}$                                                      | $P=0,40^{[3]}$                                                   | $P=0,14^{[3]}$                  |
| Subtipo histológico | $P=0,42^{[3]}$                  | $P=0,11^{[3]}$                      | <b><math>P&lt;0,01^{[3]}</math></b>                                 | $P=0,47^{[3]}$                                                   | $P=0,11^{[3]}$                  |
| Breslow             | $r_s=0,06$<br>$P=0,65^{[1]}$    | $r_s=0,21$<br>$P=0,11^{[1]}$        | $r_s= - 0,16$<br>$P=0,22^{[1]}$                                     | <b><math>r_s=0,33</math></b><br><b><math>P=0,01^{[1]}</math></b> | $r_s= - 0,07$<br>$P=0,58^{[1]}$ |
| Ulceração           | $P=0,60^{[4]}$                  | $P=0,86^{[4]}$                      | $P=0,10^{[4]}$                                                      | $P=0,34^{[4]}$                                                   | $P=0,77^{[4]}$                  |
| Regressão           | $P=0,51^{[4]}$                  | $P=0,39^{[4]}$                      | $P=0,99^{[4]}$                                                      | $P=0,12^{[4]}$                                                   | $P=0,79^{[4]}$                  |
| Clark               | $r_s=0,08$<br>$P=0,50^{[1]}$    | $r_s=0,22$<br>$P=0,07^{[1]}$        | $r_s= - 0,10$<br>$P=0,41^{[1]}$                                     | <b><math>r_s=0,26</math></b><br><b><math>P=0,04^{[1]}</math></b> | $r_s=0,02$<br>$P=0,88^{[1]}$    |
| Índice mitótico     | $r_s=0,11$<br>$P=0,40^{[1]}$    | $r_s=0,19$<br>$P=0,16^{[1]}$        | $r_s= - 0,20$<br>$P=0,13^{[1]}$                                     | $r_s=0,16$<br>$P=0,22^{[1]}$                                     | $r_s= - 0,02$<br>$P=0,89^{[1]}$ |
| Fase de crescimento | $P=0,73^{[2]}$                  | $P=0,13^{[2]}$                      | $P=0,78^{[2]}$                                                      | $P=0,06^{[2]}$                                                   | $P=0,76^{[2]}$                  |
| IILPT               | $r_s= - 0,18$<br>$P=0,18^{[1]}$ | $r_s= - 0,06$<br>$P=0,66^{[1]}$     | $r_s= - 0,05$<br>$P=0,72^{[1]}$                                     | $r_s= - 0,05$<br>$P=0,72^{[1]}$                                  | $r_s= - 0,06$<br>$P=0,66^{[1]}$ |
| IIIT                | $r_s= - 0,03$<br>$P=0,80^{[1]}$ | $r_s= - 0,10$<br>$P=0,47^{[1]}$     | $r_s=0,06$<br>$P=0,67^{[1]}$                                        | $r_s=0,23$<br>$P=0,08^{[1]}$                                     | $r_s=0,07$<br>$P=0,58^{[1]}$    |
| Margem cirúrgica    | $P=0,50^{[2]}$                  | $P=0,82^{[2]}$                      | $P=0,34^{[2]}$                                                      | $P=0,89^{[2]}$                                                   | $P=0,18^{[2]}$                  |
| Metástases          | $P=0,48^{[2]}$                  | $P=0,66^{[2]}$                      | —                                                                   | $P=0,66^{[2]}$                                                   | —                               |

Células T. Epidérmicas: células tumorais epidérmicas; Células T. Dérmicas: células tumorais dérmicas. IILPT: infiltrado inflamatório linfocitário peritumoral; IIIT: infiltrado inflamatório intratumoral.

P: significância estatística;  $r_s$ : coeficiente de correlação de Spearman; [1]: t de Student para significância de  $r_s$ ; [2] teste U de Mann-Whitney; [3] teste H de Kruskal-Wallis; [4] teste de qui-quadrado de tendência linear.

**Tabela 3.**

Tabela 3 – Avaliação da associação entre a expressão do TIMP-2 no melanoma cutâneo e seus fatores prognósticos (n=86).

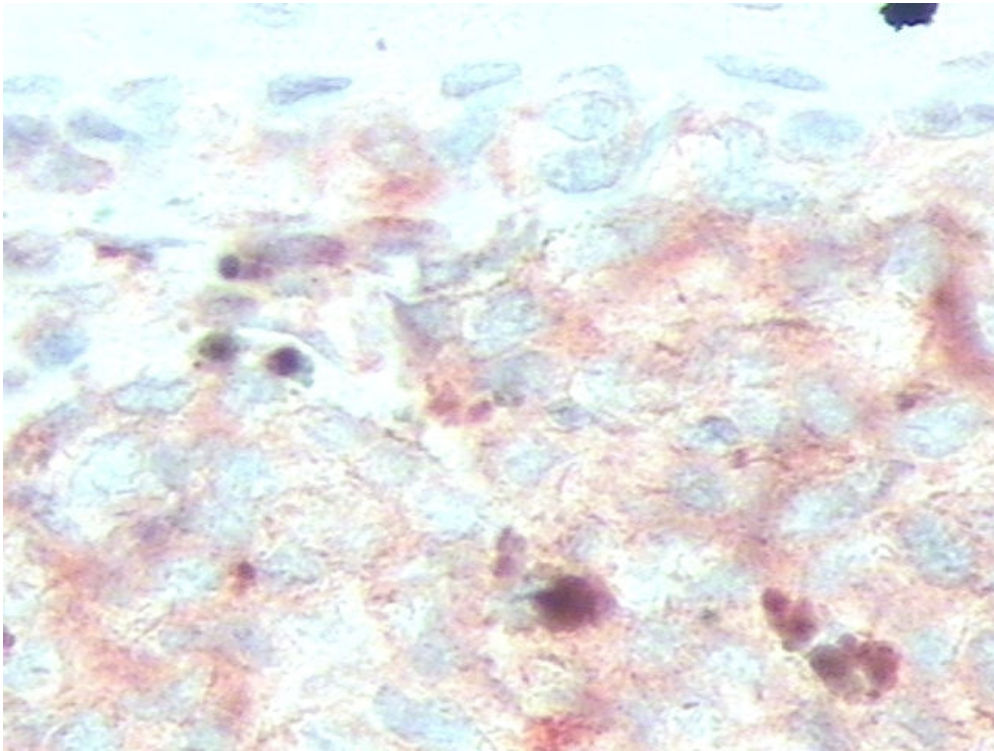
| Variável            | Estroma                         | Vasos                           | Células T. Epidérmicas            | Células T. Dérmicas              | Queratinócitos                  |
|---------------------|---------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|
| Idade               | $r_s = -0,14$<br>$P=0,21^{[1]}$ | $r_s = -0,2$<br>$P=0,87^{[1]}$  | $r_s = -0,35$<br>$P < 0,01^{[1]}$ | $r_s = -0,8$<br>$P=0,49^{[1]}$   | $r_s = -0,08$<br>$P=0,52^{[1]}$ |
| Sexo                | $P < 0,01^{[2]}$                | $P=0,32^{[2]}$                  | $P=0,29^{[2]}$                    | $P=0,26^{[2]}$                   | $P=0,44^{[2]}$                  |
| Topografia          | $P=0,91^{[3]}$                  | $P=0,98^{[3]}$                  | $P=0,25^{[3]}$                    | $P=0,36^{[3]}$                   | $P=0,73^{[3]}$                  |
| Subtipo histológico | $P=0,97^{[3]}$                  | $P=0,87^{[3]}$                  | $P=0,10^{[3]}$                    | $P=0,46^{[3]}$                   | $P=0,63^{[3]}$                  |
| Breslow             | $r_s = -0,12$<br>$P=0,37^{[1]}$ | $r_s = -0,15$<br>$P=0,27^{[1]}$ | $r_s = -0,15$<br>$P=0,27^{[1]}$   | $r_s = 0,32$<br>$P = 0,01^{[1]}$ | $r_s = -0,01$<br>$P=0,97^{[1]}$ |
| Ulceração           | $P=0,85^{[4]}$                  | $P=0,23^{[4]}$                  | $P=0,87^{[4]}$                    | $P=0,08^{[4]}$                   | $P=0,99^{[4]}$                  |
| Regressão           | $P=0,86^{[4]}$                  | $P=0,99^{[4]}$                  | $P=0,65^{[4]}$                    | $P=0,71^{[4]}$                   | $P=0,38^{[4]}$                  |
| Clark               | $r_s = -0,08$<br>$P=0,49^{[1]}$ | $r_s = -0,05$<br>$P=0,70^{[1]}$ | $r_s = -0,30$<br>$P < 0,01^{[1]}$ | $r_s = 0,20$<br>$P=0,12^{[1]}$   | $r_s = -0,21$<br>$P=0,08^{[1]}$ |
| Índice mitótico     | $r_s = -0,03$<br>$P=0,85^{[1]}$ | $r_s = -0,08$<br>$P=0,56^{[1]}$ | $r_s = -0,12$<br>$P=0,37^{[1]}$   | $r_s = 0,32$<br>$P = 0,02^{[1]}$ | $r_s = -0,09$<br>$P=0,52^{[1]}$ |
| Fase de crescimento | $P=0,14^{[2]}$                  | $P=0,55^{[2]}$                  | $P=0,21^{[2]}$                    | $P=0,08^{[2]}$                   | $P=0,10^{[2]}$                  |
| IILPT               | $r_s = -0,01$<br>$P=0,97^{[1]}$ | $r_s = 0,04$<br>$P=0,78^{[1]}$  | $r_s = 0,06$<br>$P=0,63^{[1]}$    | $r_s = -0,10$<br>$P=0,44^{[1]}$  | $r_s = -0,09$<br>$P=0,49^{[1]}$ |
| IIIT                | $r_s = 0,03$<br>$P=0,80^{[1]}$  | $r_s = -0,04$<br>$P=0,77^{[1]}$ | $r_s = -0,04$<br>$P=0,79^{[1]}$   | $r_s = 0,04$<br>$P=0,76^{[1]}$   | $r_s = -0,13$<br>$P=0,32^{[1]}$ |
| Margem cirúrgica    | $P = 0,05^{[2]}$                | $P=0,69^{[2]}$                  | $P=0,43^{[2]}$                    | $P=0,71^{[2]}$                   | $P=0,84^{[2]}$                  |
| Metástases          | $P=0,57^{[2]}$                  | $P=0,49^{[2]}$                  | —                                 | $P=0,31^{[2]}$                   | —                               |

Células T. Epidérmicas: células tumorais epidérmicas; Células T. Dérmicas: células tumorais dérmicas. IILPT: infiltrado inflamatório linfocitário peritumoral; IIIT: infiltrado inflamatório intratumoral.

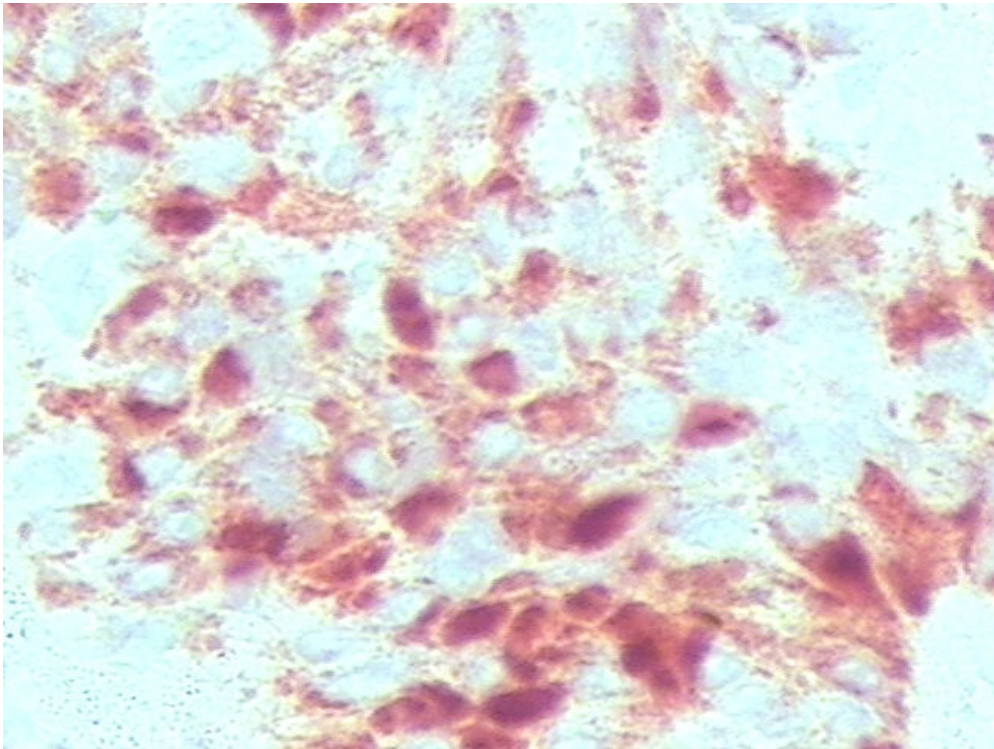
P: significância estatística;  $r_s$ : coeficiente de correlação de Spearman; [1]: t de Student para significância de  $r_s$ ; [2] teste U de Mann-Whitney; [3] teste H de Kruskal-Wallis; [4] teste de qui-quadrado de tendência linear.

As variáveis invasão vascular linfática e sanguínea, invasão perineural e satelitose microscópica não puderam ser analisadas devido à frequência muito baixa de eventos observados.

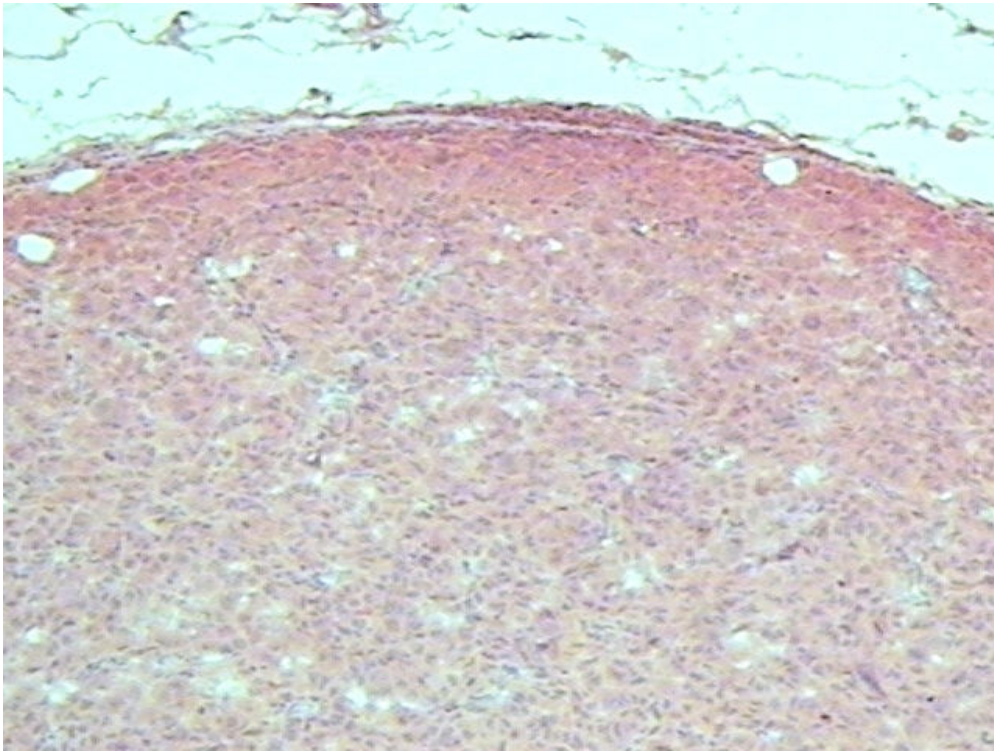
**Fotografias demonstrando a expressão imuno-histoquímica da MMP-2 e do TIMP-2 em casos de melanoma primário e metástases cutânea estão representadas pelas figuras 1, 2 e 3.**



**Figura 1 – Expressão da MMP-2 no melanoma tipo espalhamento superficial: estroma 3+ (imunoperoxidase – AEC, 400 x, no original).**



**Figura 2 – Expressão do TIMP-2 no melanoma tipo espalhamento superficial: células tumorais epidérmicas 2+ (imunoperoxidase – AEC, 400 x, no original).**



**Figura 3 – Expressão da MMP-2 em metástase cutânea de melanoma: estroma 1+; vasos 3+; células tumorais dérmicas 3+ (imunoperoxidase – AEC, 50 x, no original).**

## Discussão

Em 1996, Väisänen e colaboradores demonstraram um aumento de expressão da MMP-2 no melanoma cutâneo, correlacionado-a a uma desordem da arquitetura dérmica, com atipia de lesões melanocíticas e com metástases hematogênicas [20].

Em outro estudo, houve uma associação entre o aumento da expressão da MMP-2 e um prognóstico desfavorável em pacientes com melanoma. A correlação entre um aumento de expressão da MMP-2 e uma baixa taxa de sobrevida foi, inclusive, um fator independente do índice de Breslow e do nível de Clark [21]. E, mais recentemente, Väisänen e colaboradores evidenciaram que a MMP-2 pode ser reconhecida como um novo marcador de prognóstico nos pacientes com melanoma [19].

A descrição amostral do presente estudo demonstrou que a maioria (63%) dos diagnósticos do melanoma cutâneo primário foi realizado em estágio onde o nível de Breslow é considerado fino (espessura máxima de 1 mm), nos quais a fase de crescimento horizontal é ainda muito importante.

A expressão da MMP-2 e do TIMP-2 ocorreu em todos os casos de melanoma cutâneo primário e em todos os casos de metástases cutâneas. Seguindo a análise semiquantitativa empregada, o índice de positividade máximo (3+) para a expressão da MMP-2 foi observado na maioria dos pacientes e, para a expressão de TIMP-2, em parcela importante dos casos (tabela 1).

Apesar deste perfil geral e demonstrando que, mesmo em melanomas finos, as presenças da MMP-2 e de seu inibidor são constantes, houve



variabilidades quanto à expressão da MMP-2 e do TIMP-2, quanto aos fatores prognósticos histopatológicos.

Neste estudo, é importante verificar que a presença da MMP-2 esteve associada principalmente a pacientes mais jovens (com expressão em células tumorais epidérmicas e, em associação no limite para a significância, com expressão em queratinócitos, conforme tabela 2), com o melanoma em membros inferiores (com expressão nos vasos dérmicos), com os melanomas de subtipo espalhamento superficial (com expressão nas células tumorais epidérmicas); mas particularmente, também, nos mais espessos (com expressão nas células tumorais dérmicas, em correlação positiva para o índice de Breslow e o nível de Clark).

Estes dados talvez favoreçam uma possível hipótese quanto à ação da radiação ultravioleta para a indução da secreção da MMP-2 por células epidérmicas (melanócitos e queratinócitos) em pacientes constitucionalmente predispostos ao melanoma cutâneo, como um dos fatores importantes na gênese do mesmo.

As células da epiderme secretam MMPs induzidas pela radiação ultravioleta e é reconhecido que o melanoma subtipo espalhamento superficial possui sua gênese relacionada à exposição ao sol, em grande parcela de pacientes [14, 22]. Em estudo anterior, já havia sido demonstrado que a exposição aguda à radiação ultravioleta eleva a expressão da MMP-2 em melanócitos de nevos [23].

*A ausência de associação específica com uma das fases de crescimento (horizontal e vertical) demonstra que a MMP-2 deve participar do desenvolvimento do*

*melanoma cutâneo desde seu princípio (crescimento horizontal) e não apenas da sua fase mais invasiva (crescimento vertical).*

A expressão imuno-histoquímica do TIMP-2 acompanha a da MMP-2 na correlação inversa com a idade (os melanócitos mais jovens talvez sejam mais reativos e secretem mais a enzima e seu inibidor e/ou os jovens possuem realmente maior exposição à radiação ultravioleta agudamente) e na associação com índices de Breslow e Clark.

Esta expressão do TIMP-2 pode ser compreendida como lógica, pois, ao produzir-se grandes quantidades de MMP-2, há uma indução natural de uma maior secreção do seu bloqueador. Paradoxalmente, o TIMP-2 também pode estimular a secreção adicional de MMP-2. Quantidades maiores desta enzima, então, não seriam mais inibidas e sua ação seria facilitada. Neste sentido, Yoshino e colaboradores demonstraram uma correlação significativa entre níveis elevados de TIMP-2 e a progressão tumoral em pacientes com melanoma [24].

No presente estudo, o TIMP-2 esteve associado a um maior índice mitótico, um fator prognóstico histopatológico com tendência a uma maior valorização, atualmente. O índice mitótico não demonstrou correlação estatisticamente significativa com a expressão da MMP-2, mas verifica-se uma correlação limítrofe (o que poderia ser decorrente de uma amostragem inferior à necessária para demonstração desta associação).

A menor expressão do TIMP-2 associada a margens cirúrgicas comprometidas e a sua maior expressão no gênero feminino devem ser atribuídas à casualidade, à luz dos conhecimentos atuais.

A presença da MMP-2 em todos os 13 casos de metástases cutâneas de melanoma também demonstra que as células tumorais permanecem secretando a MMP-2 em outros sítios. Possivelmente a MMP-2 participe da viabilização dos implantes metastáticos em tecidos diferentes, através de suas ações angiogênicas, pró-mitóticas e colagenolíticas.

## **11. Conclusões**

Este estudo demonstrou que a MMP-2 apresenta maior expressão em jovens e em melanomas de membros inferiores. A sua expressividade é maior nos melanomas do tipo espalhamento superficial.

A MMP-2 pode participar tanto das fases iniciais do desenvolvimento do melanoma cutâneo primário, quanto de fases invasivas e relacionar-se com fatores histopatológicos importantes do tipo índice de Breslow e nível de Clark. A MMP-2 também está presente nas metástases cutâneas do melanoma. O seu inibidor natural, TIMP-2, possui uma expressão imuno-histoquímica semelhante a da MMP-2 no melanoma primário e metástases cutâneas.

## **12. Agradecimentos**

Este trabalho recebeu apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES – Brasil. Os autores agradecem ao auxílio fundamental da senhora Rosalva Tereza Meurer, da Professora Dra. Maria Isabel Albano Edelweiss e do Professor Dr. Mário Bernardes Wagner.

**Referências bibliográficas**

1. Venegas, L.F.P., et al., *Melanoma Maligno cutâneo no Rio Grande do Sul*. Rev Ass Med Brasil, 1992. 38(3): p. 122-6.
2. Bakos, L., et al., *Sunburn, sunscreens, and phenotypes: some risk factors for cutaneous melanoma in southern Brazil*. International Journal of Dermatology, 2002. 41: p. 557-562.
3. Azevedo, G. and S. Mendonça, *Risco crescente de melanoma de pele no Brasil*. Revista de Saúde Pública, 1992. 26(4): p. 290-294.
4. Flórez, Á. and M. Cruces, *Melanoma epidemic: True or false?* International Journal of Dermatology, 2004. 43: p. 405-407.
5. Marks, R., *Epidemiology of melanoma*. Clinical and Experimental Dermatology, 2000. 25: p. 459-463.
6. Thompson, J.F., R.A. Scolyer, and R.F. Kefford, *Cutaneous Melanoma*. The Lancet, 2005. 365: p. 687-701.
7. Cummins, D.L., et al., *Cutaneous Malignant Melanoma*. Mayo Clin Proc, 2006. 81(4): p. 500-507.
8. Miller, A.J. and M. Mihm Jr, *Melanoma*. The New England Journal of Medicine, 2006. 355: p. 51-65.
9. Landman, G. and etal, *Consenso para o laudo anatomopatológico do melanoma cutâneo: Grupo Multicêntrico e Multidisciplinar Brasileiro para Estudo do Melanoma (GBM)*. Acta Oncológica Brasileira, 2003. 23(10).

10. Visse, R. and H. Nagase, *Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors os Metalloproteinases*. *Circulation Research*, 2003. 92: p. 827-839.
11. Clark, I.M., et al., *The regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors*. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2008. 40: p. 1362-1378.
12. Konstantinopoulos, P.A., et al., *Matrix metalloproteinase inhibitors as anticancer agents*. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2008. 40: p. 1156-1168.
13. Seltzer, J. and A. Eisen, *O Papel das Metaloproteinases da Matriz na Remodelação do Tecido Conjuntivo*, in *Dermatologia*, Fitzpatrick, Editor. 2003.
14. Fisher, G.J., et al., *Pathophysiology of Premature Skin Aging Induced by Ultraviolet Light*. *The New England Journal of Medicine*, 1997. 337(20): p. 1419-1428.
15. Chang, C. and Z. Werb, *The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis*. *TRENDS in Cell Biology*, 2001. 11(11): p. S37.
16. Hofmann, U.B., et al., *Matrix Metalloproteinases in Human Melanoma*. *The Journal of Investigative Dermatology*, 2000. 115: p. 337-344.
17. Redondo, P., et al., *Expression and serum levels of MMP-2 and MMP-9 during human melanoma progression*. *Clinical and Experimental Dermatology*, 2005. 30: p. 541-545.

18. Hsu, S.M., L. Raine, and H. Fanger, *The use of antiavidin antibody and avidin-biotin-peroxidase complex in immunoperoxidase technics*. *Am J Clin Pathology*, 1981. 75(6): p. 816-21.
19. Vaisanen, A.H., M. Kallioinen, and T. Turpeenniemi-Hujanen, *Comparison of the prognostic value of matrix metalloproteinases 2 and 9 in cutaneous melanoma*. *Human Pathology*, 2008. 39: p. 377-385.
20. Vaisanen, A., et al., *Matrix Metalloproteinase-2 (72 kD Type IV Collagenase) expression occurs in the early stage of human melanocytic tumor progression and may have prognostic value*. *Journal of Pathology*, 1996. 180: p. 283-289.
21. Vaisanen, A., et al., *Prognostic value of MMP-2 immunoreactive protein (72 kD type IV collagenase) in primary skin melanoma*. *Journal of Pathology*, 1998. 186: p. 51-58.
22. Markovic, S.N., et al., *Malignant Melanoma in the 21st Century, Part 1: Epidemiology, Risk Factors, Screening, Prevention, and Diagnosis*. *Mayo Clin Proc*, 2007. 82(3): p. 364-380.
23. Bakos, R.M., et al., *Immunohistochemical expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 in melanocytic nevi is altered by ultraviolet B*. *Photodermatology Photoimmunology & Photomedicine*, 2007. 23: p. 250-254.
24. Yoshino, Y., et al., *Clinical relevance of serum levels of matrix metalloproteinase-2, and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and -2 in patients with malignant melanoma*. *Journal of Dermatology*, 2008. 35: p. 206-214.

## 7. ANEXOS

### 7.1. Considerações éticas

O trabalho foi submetido à análise do Comitê de Ética em Pesquisa do Complexo Hospitalar Santa Casa de Porto Alegre e da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre - UFCSPA. Os pesquisadores assinaram o termo de compromisso quanto ao sigilo para utilização de dados segundo a resolução CNS 196/96.

Foi confeccionado um Termo de Consentimento Institucional que serve para reiterar o compromisso com o sigilo dos dados obtidos com a pesquisa.

Este trabalho de pesquisa foi aprovado por ambos os Comitês de Ética em Pesquisa. Pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Complexo Hospitalar da Santa Casa de Porto Alegre – CHSC foi aprovado, conforme parecer consubstanciado número 215/06 em 05/07/2006. Finalmente, pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre - UFCSPA (à época FFFCMPA) foi aprovado, conforme parecer consubstanciado número 228-06 em 10/08/2006.



## 7.2. Termo de compromisso para utilização de dados

Título do Projeto:

### **Estudo da Expressão da Metaloproteinase-2 da Matriz no Melanoma e sua Relação com os Fatores Prognósticos Histopatológicos**

Os pesquisadores do presente projeto comprometem-se a preservar a privacidade dos pacientes cujos dados serão coletados em prontuários e bases de dados do Complexo Hospitalar Santa Casa. Concordam, igualmente, que estas informações serão utilizadas única e exclusivamente para execução do presente projeto. As informações somente poderão ser divulgadas de forma anônima.

Porto Alegre, \_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 200\_.

| <b>Nome dos Pesquisadores</b>        | <b>Assinatura</b> |
|--------------------------------------|-------------------|
| Maria Carolina Widholzer Rey         |                   |
| Renan Rangel Bonamigo                |                   |
| Roque Furian                         |                   |
| Rafael Bonfá                         |                   |
| Raquel Bonfá                         |                   |
| <b>Chefe do Serviço de Patologia</b> |                   |
| Rui Luzzatto                         |                   |

### 7.3. Detalhamento da técnica imuno-histoquímica

As avaliações imuno-histoquímicas para MMP2 e TIMP2 de todos os casos foram realizadas a partir dos blocos de parafina dos casos selecionados do Laboratório de Patologia do CHSC. Todas as lâminas foram feitas no laboratório de Patologia da Pós-graduação da UFCSPA pela mesma profissional técnica, objetivando minimizar possíveis variações do método.

Os espécimes, já incluídos em parafina, foram cortados e submetidos à técnica de imuno-histoquímica validada cientificamente (Thewes, Woret et al. 1999; Ohnishi, Tajima et al. 2001):

a) Desparafinização: colocação dos cortes nas lâminas previamente tratadas com solução de organossilano, em estufa a 60°C, por 10 minutos.

b) Reidratação, utilizando sequencialmente xilol, álcool absoluto, álcool a 70% e água destilada, por cinco minutos cada banho, em temperatura ambiente.

c) Bloqueio da peroxidase endógena, utilizando água oxigenada a 3% por vinte minutos em temperatura ambiente.

d) Recuperação antigênica: imersão das lâminas em tampão citrato 0,01M com pH=6,0 em banho-maria, entre 95-99°C por 30 minutos e, após, descanso de 20 minutos.

e) Aplicação do anticorpo primário para MMP-2 (Novocastra® Laboratories, Newcastle upon Tyne, United Kingdom) na diluição de 1/30. O controle positivo utilizado foi tecido placentário. Para TIMP 2 (Novocastra® Laboratories, Newcastle upon Tyne, United Kingdom) na diluição de 1/25. O controle positivo utilizado foi tecido placentário.

f) Aplicação do anticorpo secundário associado ao sistema de amplificação complexo estreptavidina-biotina marcado por 30 minutos.

g) Adição da solução cromógena diaminobenzidina (DAB) por 1-3 minutos.

h) Adição de solução cromógena 3-Amino-9-etil carbazole (AEC) por 15 minutos em outras lâminas dos mesmos casos.

i) Contracoloração com Giemsa.

Desde o item d, inclusive, procede-se à lavagem com tampão PBS (cloreto de sódio + fosfato de sódio monobásico + fosfato de sódio dibásico), com pH=7,6, à temperatura ambiente, entre cada etapa.

j) Desidratação.

k) Montagem da lâmina com glicerina tamponada.

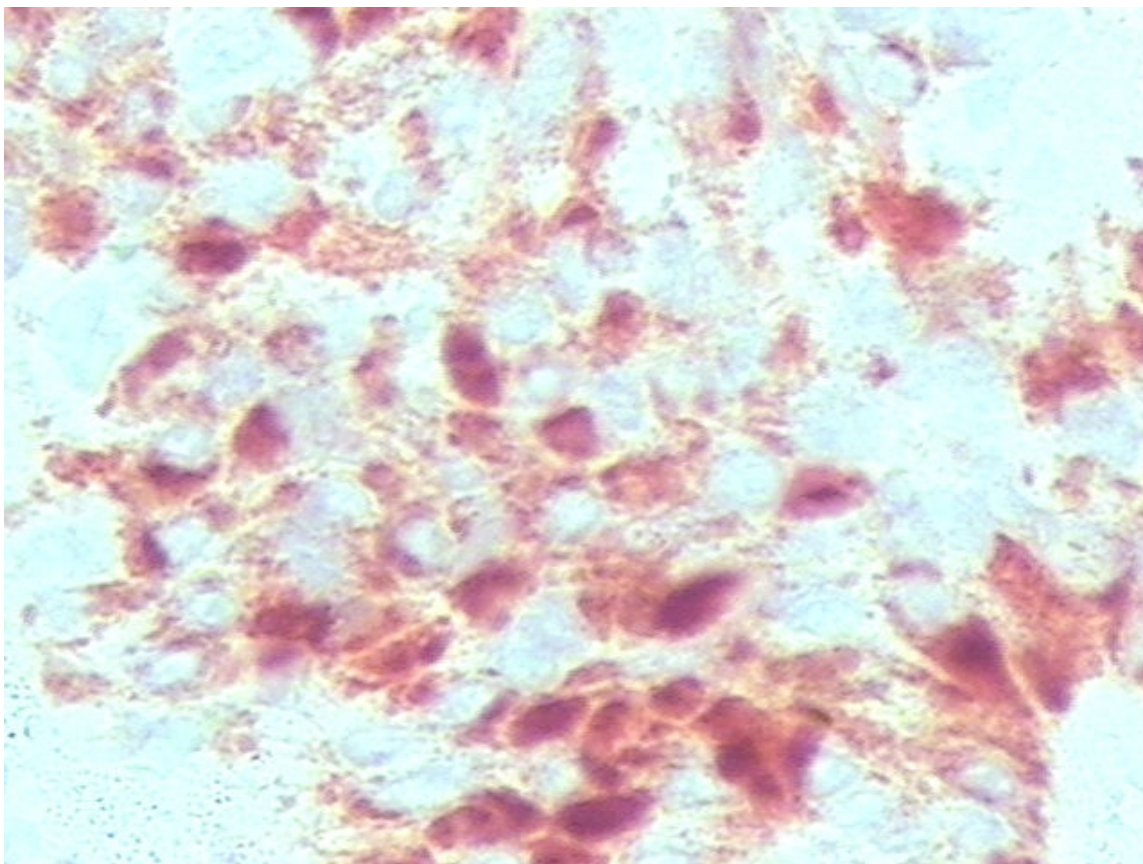
l) As lâminas foram armazenadas refrigeradas em geladeira entre 4 e 8 graus.



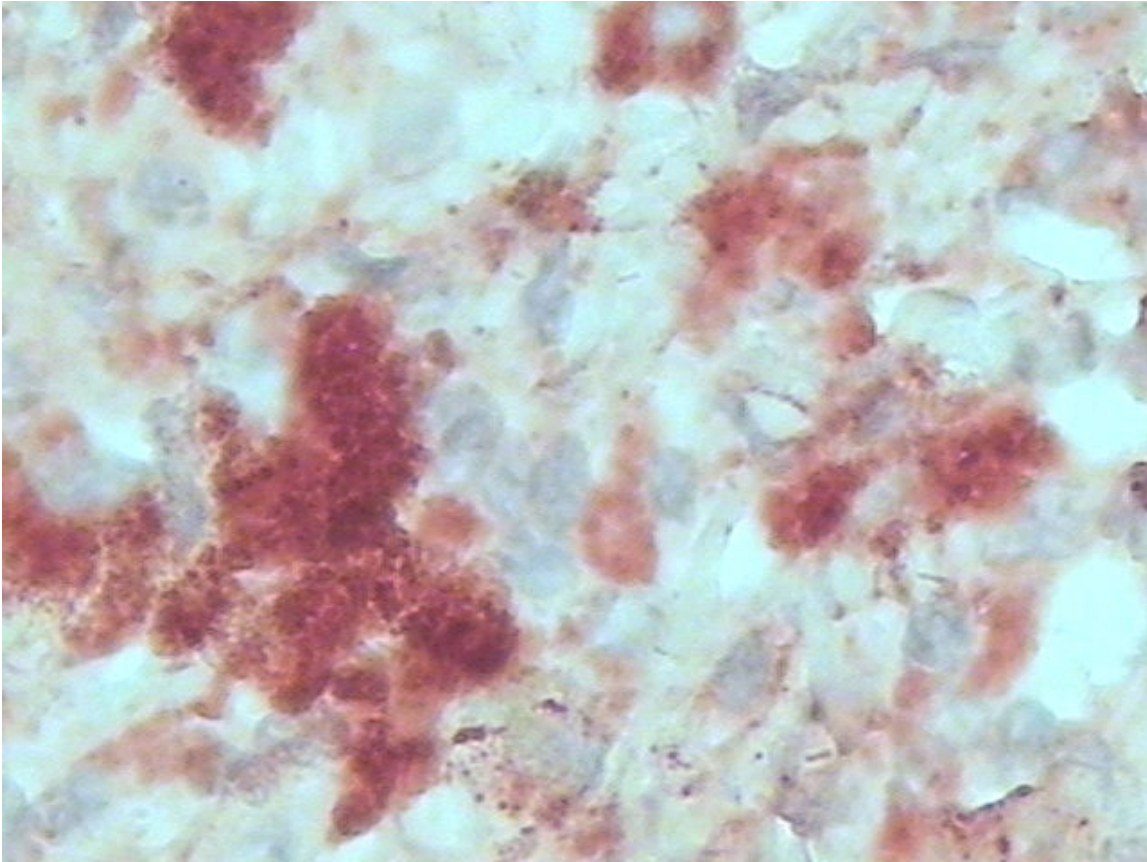
### 7.5. Fotografias do trabalho



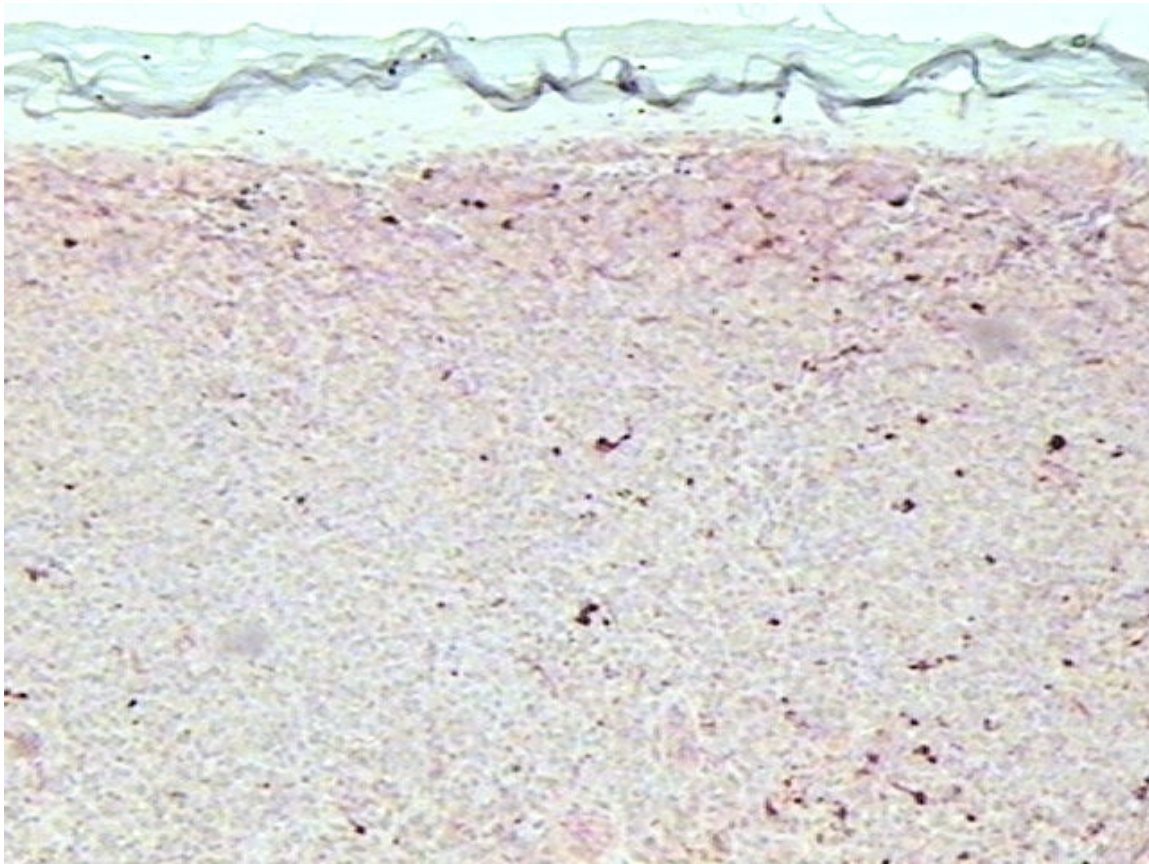
**Foto 1 – Expressão da MMP-2 no melanoma tipo espalhamento superficial: vasos 2+; células tumorais epidérmicas 2+; células tumorais dérmicas 1+ e queratinócitos 1+ (imunoperoxidase – AEC, 50 x, no original).**



**Foto 2 – Expressão do TIMP-2 no melanoma tipo espalhamento superficial: células tumorais epidérmicas 2+ (imunoperoxidase, 400x, no original).**

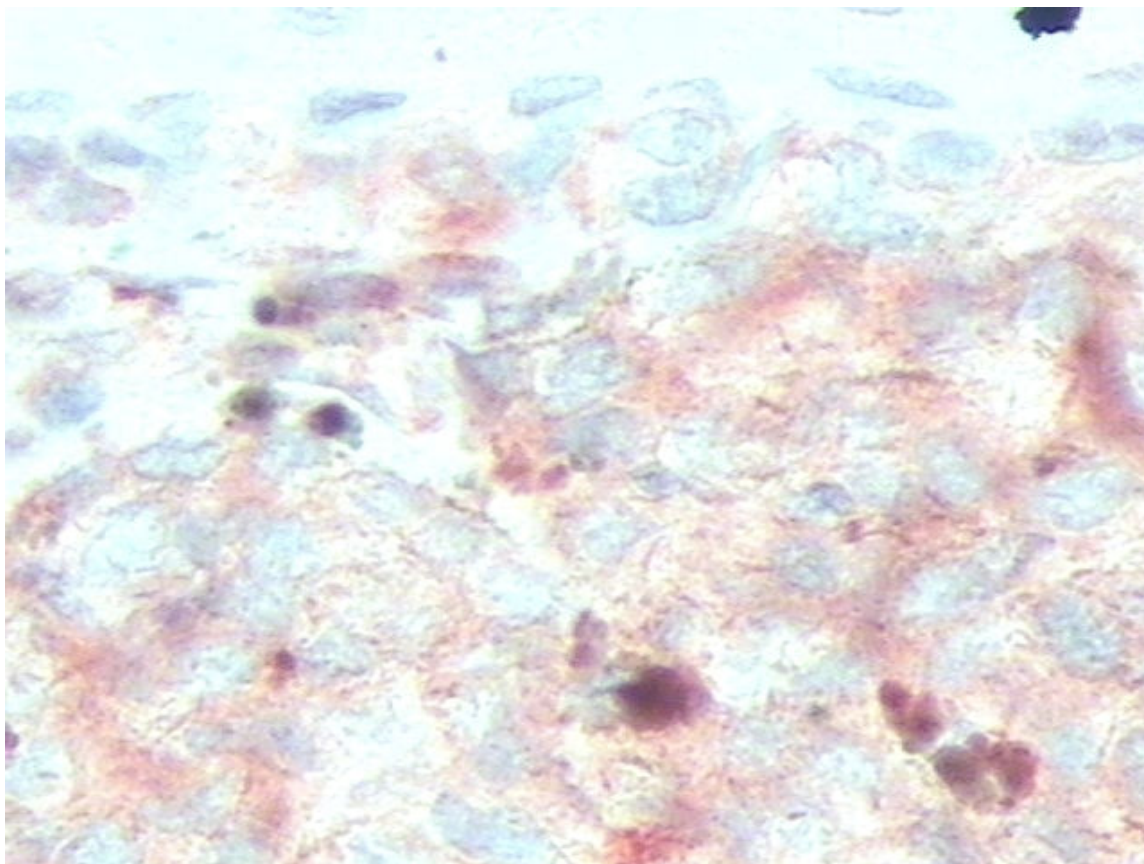


**Foto 3 – Expressão da MMP-2 no melanoma tipo espalhamento superficial: estroma 1+ e células tumorais dérmicas 3+ (imunoperoxidase – AEC, 400 x, no original).**

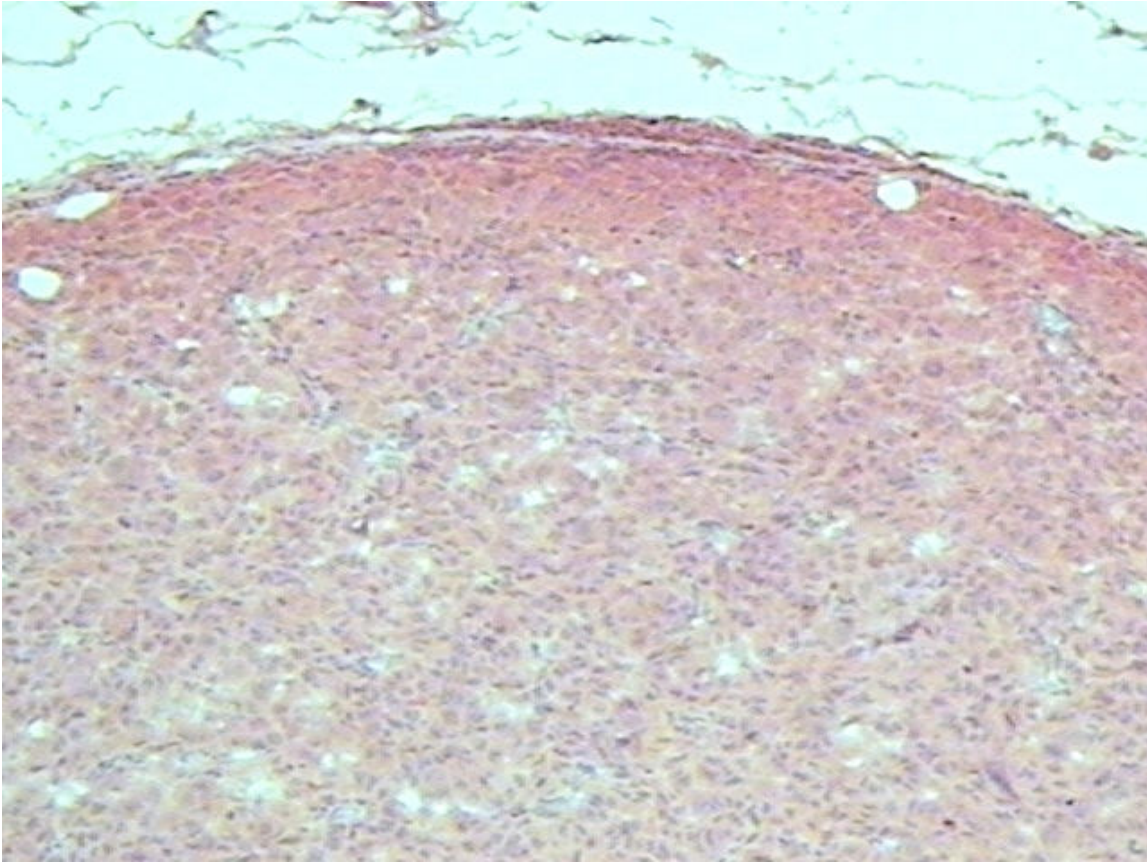


**Foto 4 – Expressão da MMP-2 no melanoma nodular: estroma 3+; vasos 3+; células tumorais epidérmicas 3+; células tumorais dérmicas 3+ e queratinócitos 1+ (imunoperoxidase – AEC, 50 x, no original).**

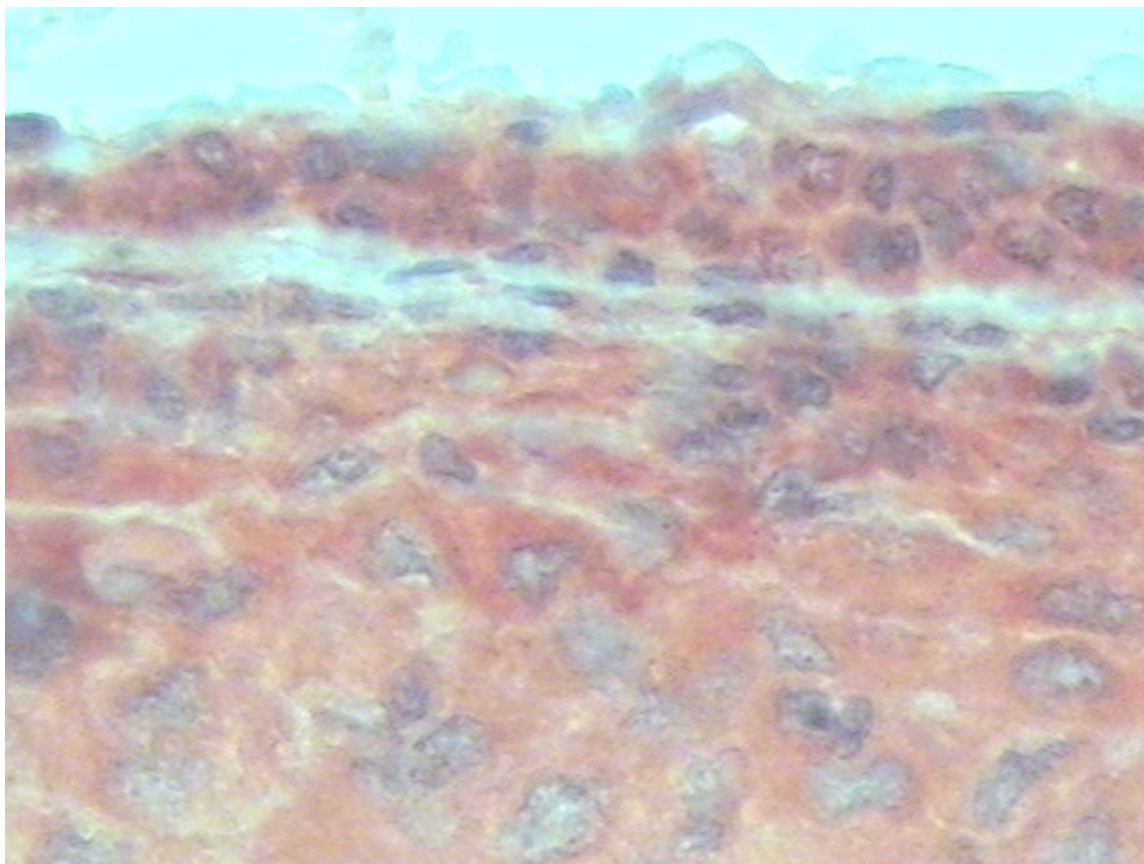




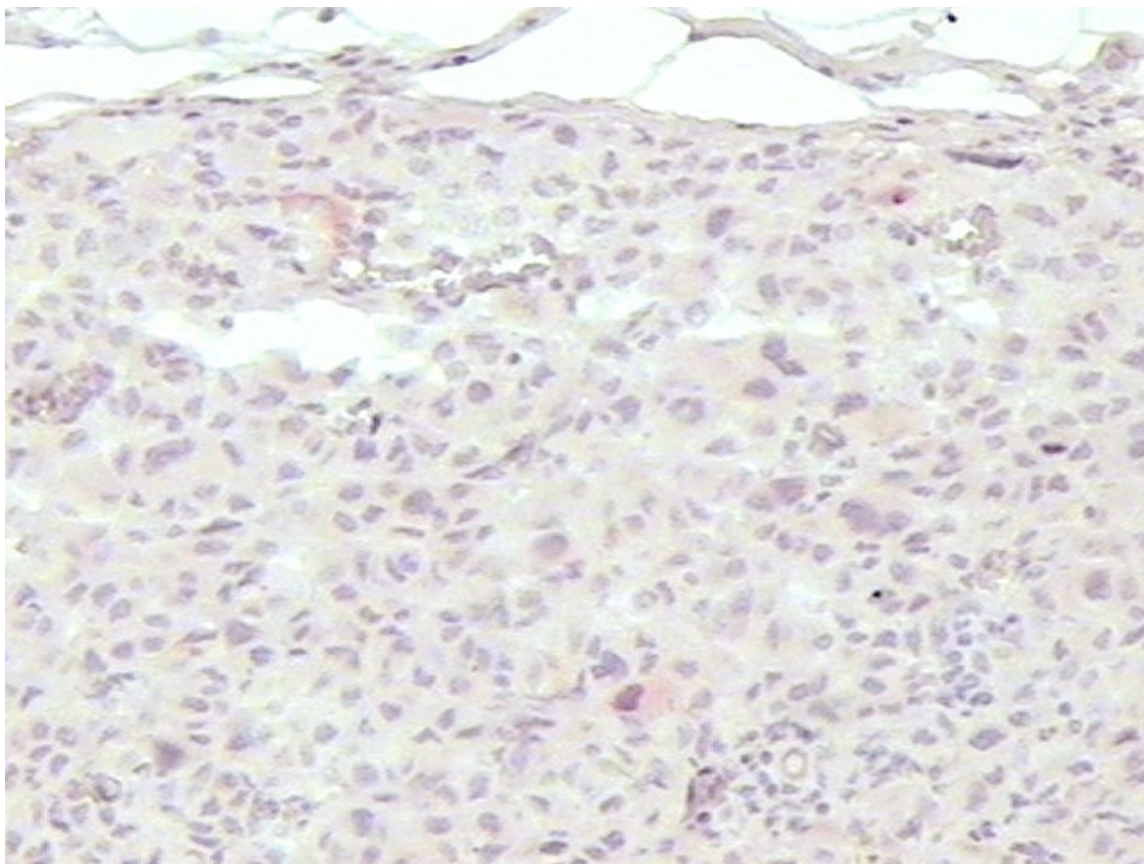
**Foto 5 – MMP-2: detalhe da expressão no estroma 3+ (imunoperoxidase – AEC, 400 x, no original).**



**Foto 6 – Expressão da MMP-2 em metástase cutânea de melanoma: estroma 1+; vasos 3+ e células tumorais dérmicas 3+ (imunoperoxidase – AEC, 50 x, no original).**



**Foto 7 – Expressão da MMP-2 em metástase cutânea de melanoma: células tumorais dérmicas 3+ (imunoperoxidase – AEC, 400 x, no original).**



**Foto 8 – Expressão do TIMP-2 em metástase cutânea de melanoma: estroma 1+ e ausência de expressão em demais estruturas (imunoperoxidase – AEC, 100 x, no original).**

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)