

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE

A EXPRESSÃO
IMUNOISTOQUÍMICA DAS
METALOPROTEINASES DA
MATRIZ E DOS SEUS INIBIDORES
TECIDUAIS NOS CARCINOMAS
BASOCELULARES

Autor: Sabrina De Stefani

Orientador: Prof. Dr. Renan Rangel Bonamigo

Co-orientador: Prof^a Dr^a Adriana Vial Roehe

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

2009

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA I
UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE

A EXPRESSÃO
IMUNOISTOQUÍMICA DAS
METALOPROTEINASES DA
MATRIZ E DOS SEUS INIBIDORES
TECIDUAIS NOS CARCINOMAS
BASOCELULARES

Autor: Sabrina De Stefani

Orientador: Prof. Dr. Renan Rangel Bonamigo

Co-orientador: Prof^a Dr^a Adriana Vial Roehe

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

2009

Ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, pela oportunidade.

Ao Professor Doutor Renan Rangel Bonamigo, pelo incentivo profissional e acadêmico desde o início da minha formação em Dermatologia, e em especial, por ser o orientador deste estudo.

À Professora Doutora Adriana Vial Roehe, pela valiosa contribuição na área da Patologia.

À patologista Dr^a Tatiana Neetzow Nunes e aos Laboratórios LABSUL/Citoclin por cederem o material em estudo.

Aos funcionários do Laboratório de Pesquisa da Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, por estarem sempre dispostos a contribuir.

À técnica do Laboratório de Pesquisa da Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre Rosalva Teresa Meurer, pela presteza e competência na confecção do material utilizado.

Às secretárias Ivonice Oliveira dos Santos e Maristela Pasin, do Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, pela atenção e auxílio prestados durante todo o estudo.

Aos preceptores do Ambulatório de Dermatologia Sanitária, por serem exemplos fundamentais para minha formação.

Ao Serviço de Dermatologia da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, onde iniciou meu interesse pela Dermatologia.

Aos colegas e amigos do Serviço de Dermatologia do Hospital Mãe de Deus, pelo apoio constante.

Aos amigos: Adriane Montserrat Ramos, Eliane de Almeida Brocker, Rodrigo Bernardes Cardoso. Minha segunda família.

Aos meus pais, Renato e Úrsula, pelo incentivo e apoio incondicionais.

Aos meus Irmãos: Fernando, pelo incentivo pessoal e profissional e Daniela pelo companheirismo e apoio em todas as horas.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro, com a bolsa de mestrado.

1	Introdução	
1.1	Revisão da Literatura	
1.1.1	O Carcinoma Basocelular	1
1.1.2	As Metaloproteinases da Matriz e os Seus Inibidores Teciduais	7
1.1.3	As Metaloproteinases da Matriz e o Carcinoma Basocelular	14
1.2	Referências Bibliográficas	16
2	Objetivos	21
3	Artigo Científico Redigido em Inglês	22
4	Artigo Científico Redigido em Português	40
5	Considerações Finais	57
6	Anexos	
6.1	Figuras da Introdução	59
6.2	Tabelas dos Artigos	62
6.3	Figuras dos Artigos	68
6.4	Figuras do Trabalho	70
6.5	Instrumento de Coleta	72
6.6	Técnica Imunoistoquímica	73
6.7	Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre	75

CBC: Carcinoma Basocelular.

CEC: Carcinoma Espinocelular.

HIV: *Human Immunodeficiency Virus*.

INCA: Instituto Nacional do Câncer.

MMP: Metaloproteinase da Matriz.

TIMP: Inibidor Tecidual da Metaloproteinase da Matriz.

UFCSPA: Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre.

Figura 1: Carcinoma Basocelular Nodular.

Figura 2: Histopatologia do Carcinoma Basocelular Nodular.

Figura 3: Carcinoma Basocelular Cístico.

Figura 4: Histopatologia do Carcinoma Basocelular Cístico.

Figura 5: Carcinoma Basocelular Superficial.

Figura 6: Histopatologia do Carcinoma Basocelular Superficial.

Figura 7: Carcinoma Basocelular Esclerodermiforme.

Figura 8: Histopatologia do Carcinoma Basocelular Esclerodermiforme.

Figura 9: Histopatologia do Carcinoma Basocelular Micronodular.

Figura 10: Fibroepitelioma de Pinkus.

Figura 11: Histopatologia do Fibroepitelioma de Pinkus.

Quadro 1: Classificação das Metaloproteinases da Matriz.

Lista de Figuras dos Artigos

Figura 1: expressão forte da MMP-9 nas células tumorais e no estroma.

Figure 1: MMP-9 strong expression in tumor cells and in stroma.

Figura 2: expressão fraca da TIMP-2 nas células tumorais e no estroma.

Figure 2: TIMP-2 weak expression in tumor cells and in stroma.

Figura 3: expressão fraca da MMP-2 nas células tumorais e forte no estroma.

Figura 4: expressão fraca da TIMP-1 nas células tumorais e no estroma.

Tabela 1. Características gerais da amostra, com medidas de tendência central e de variabilidade.

Table 1. General characteristics of the sample, with central tendency and variability measures.

Tabela 2. MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2 e o tipo histológico de CBC: expressão imunoistoquímica.

Table 2. MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2 and the histological type of BCC: immunohistochemical expression.

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Programa de Pós-graduação em Patologia

Resumo da Dissertação de Mestrado

Título do trabalho: A EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DAS METALOPROTEINASES DA MATRIZ E DOS SEUS INIBIDORES TECIDUAIS NOS CARCINOMAS BASOCELULARES.

Nome do aluno: Sabrina De Stefani

Orientador: Prof. Dr. Renan Rangel Bonamigo

Co-orientador: Prof^a Dr^a Adriana Vial Roehe

Instituição de vínculo: Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre. Instituição onde desenvolveu a pesquisa: Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre. Rua Sarmiento Leite, 245.

Email: sabrinadss@gmail.com

Palavras-chave: metaloproteinases, gelatinases, carcinomas

Introdução

X

Os Carcinomas Basocelulares (CBCs) possuem crescimento lento e são destrutivos localmente. Sua mortalidade é extremamente baixa, mas têm morbidade significativa, se não diagnosticados e tratados adequadamente.

As metaloproteinases da matriz (MMPs) são enzimas do grupo das proteases. As alterações da secreção ou regulação destas enzimas podem alterar o equilíbrio extracelular da derme e contribuir para o desenvolvimento de processos patogênicos, inclusive neoplásicos. As gelatinases consistem no grupo de maior reconhecimento de suas atividades patogênicas. As representantes deste grupo são as gelatinases A e B ou metaloproteinases tipo 2 (MMP-2) e 9 (MMP-9), respectivamente.

Objetivos

O objetivo principal foi o de avaliar a expressão imunohistoquímica das metaloproteinases da matriz MMP-2 e MMP-9 e dos seus inibidores teciduais TIMP-1 e TIMP-2 nos carcinomas basocelulares; e particularmente verificar se há relação preferencial destes marcadores com determinados subtipos de carcinoma basocelular.

Material e métodos

Com um delineamento de estudo transversal, foram avaliadas histopatologicamente biópsias cutâneas (incisionais e excisionais), com o diagnóstico de carcinoma basocelular, selecionadas consecutivamente em um laboratório de Patologia (LABSUL) da cidade de Porto Alegre (Brasil), durante o ano de 2007. As lâminas foram posteriormente

revisadas e submetidas à técnica de imunistoquímica para MMP-2, MMP9, TIMP-1, TIMP-2, no laboratório do Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA).

Resultado da pesquisa e discussão

A maioria dos CBCs foi classificada como sólido (69,4%), seguida dos superficiais (20,8%) e esclerodermiformes e infiltrativos (9,7%).

No presente estudo foram encontradas algumas particularidades que podem auxiliar quanto à compreensão da distribuição das gelatinases e dos seus inibidores nos diferentes tipos de carcinomas basocelulares.

Verificou-se que a MMP-2, a qual é geralmente definida como uma metaloproteinase da matriz que contribui muito para a invasividade tumoral, esteve expressa de forma semelhante no carcinoma considerado menos invasivo (superficial), no mais freqüente (nodular) e nos mais invasivos (esclerodermiforme e infiltrativo).

A expressão do TIMP-1 nas células tumorais, foi superior, mas não de maneira estatisticamente significativa, nos CBCs superficiais (92,85% com expressão, sendo 71,4% com expressão fraca e 21,4% com expressão forte) quando comparados aos esclerodermiformes e infiltrativos (57,1%, todos com expressão fraca).

Estes resultados sugerem que a MMP-2 poderia exercer maior ação nos esclerodermiformes e infiltrativos, pois nestes existe uma possibilidade maior de ausência de expressão de seu inibidor, o TIMP-1.

Observou-se uma tendência da expressão da MMP-9 nas células tumorais ser fraca no CBC superficial (60%) e ser forte nos CBC esclerodermiformes (85,7%). Porém, estas associações não se mostraram significativas ($p=0,144$).

Em relação ao TIMP-2, a análise de sua expressão nas células tumorais e no estroma demonstra um certo predomínio da expressão fraca em todos os tipos de CBCs, o que parece contrastar com o predomínio da expressão forte nas células tumorais da MMP-9 nos CBCs esclerodermiformes e infiltrativos. O contexto poderia favorecer uma maior ação da MMP-9 na patogênese tumoral, em particular no tipo esclerodermiforme. O reduzido número de casos de CBCs esclerodermiformes e infiltrativos impediu uma análise estatística mais consistente para estes achados.

Conclusões

O estudo imunoistoquímico das gelatinases A e B e de seus inibidores naturais nos diferentes tipos histológicos de CBCs demonstra uma freqüente expressão dos marcadores estudados.

O inibidor da MMP-2, TIMP-1, mostrou tendência a ser menos expresso nos casos de CBCs esclerodermiformes e infiltrativos. Possivelmente, ocorra um desequilíbrio da expressão entre a MMP-2 e o TIMP-1 e entre a MMP-9 e o TIMP-2 nos CBCs esclerodermiformes e infiltrativos, porém estudos que incluam uma quantidade maior destes tipos

de carcinoma basocelular devem ser realizados para confirmar esta hipótese.

1.1 Revisão da Literatura

1.1.1 O Carcinoma Basocelular

O câncer de pele é a neoplasia mais comum entre os seres humanos. Aproximadamente 80% das neoplasias malignas de pele não melanomas são carcinomas basocelulares (CBCs). (Ribeiro *et al*, 2008).

O número de casos de CBC não é preciso (por não haver notificação compulsória). Segundo dados do INCA (Instituto Nacional do Câncer), o número de casos novos de câncer de pele não melanoma estimados para o Brasil em 2010 é 113 850 casos. (Estimativa 2010, Incidência do Câncer no Brasil. Acesso em 14/03/10, em: http://www.inca.gov.br/estimativa/2010/index.asp?link=tbregioes_consolidado.asp&ID=1).

Os CBCs possuem crescimento lento, são destrutivos localmente, são raramente metastáticos e são derivados das células basais da epiderme inferior. Sua mortalidade é extremamente baixa, mas têm morbidade significativa, se não diagnosticados e tratados adequadamente. (Fitzpatrick *et al*, 1999).

Os CBCs são particularmente comuns em caucasianos e raros em negros. Nos Estados Unidos, o risco de um caucasiano desenvolver um CBC durante a vida é estimado em 30%. (American Cancer Society, 2000).

Quanto ao sexo, a incidência de CBC em homens é cerca de 30% maior do que em mulheres, particularmente a do CBC superficial. (Chuang *et al*, 1990; Hannuksela *et al*, 1995; Green *et al*, 1996).

A incidência do CBC também varia de acordo com a latitude. Países próximos ao Equador têm incidência maior da neoplasia quando comparados a países mais distantes. (Chuang *et al*, 1990; Reizner *et al*, 1993).

A radiação solar é um fator importante na gênese do CBC. A pele clara, os olhos e os cabelos claros, a descendência européia, a presença de sardas na infância, a história de queimaduras solares, a idade avançada e o uso de óleos para bronzear são fatores de risco para o desenvolvimento precoce do CBC. (Boyd *et al*, 2002; Christenson *et al*, 2005).

A exposição solar intensa e intermitente parece aumentar mais o risco de desenvolvimento do CBC quando comparada a mesma intensidade de exposição de maneira regular. (Ramsey *et al*, 2003).

Por outro lado, diversos estudos mostram que o uso de protetores solares diminui a incidência de CBCs. (Naylor *et al*, 1995; Green *et al*, 1999; Dennis *et al*, 2003).

Quanto maior a idade, maior a incidência do CBC. Esta incidência, entretanto, parece estar aumentando entre indivíduos com menos de 40 anos, particularmente em mulheres. (Christenson *et al*, 2005).

A exposição crônica ao arsênico é, também, fator de risco para o desenvolvimento de CBCs. A neoplasia pode surgir até 40 anos após o período de exposição. (Tão *et al*, 1996; Karaga *et al*, 1998; Boonchai *et al*, 2000).

O risco de CBC também é maior entre pacientes submetidos a fototerapia, a radioterapia ionizante e a imunossupressão crônica pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), por transplante de órgãos, por uso de corticoesteróides. (Karagas *et al*, 1996. Lichter *et al*, 2000, Euvrad *et al*, 2003).

Algumas doenças genéticas estão relacionadas a maior incidência de CBCs: síndrome do nevo basocelular, xeroderma pigmentoso, albinismo óculo-cutâneo e epidermólise bolhosa são exemplos. (Fine *et al*, 2009).

O diagnóstico precoce da neoplasia (CBC), com um tratamento adequado, é geralmente curativo. Certos tipos de CBC, entretanto, são mais agressivos do que outros e podem receber tratamentos especiais. Essa agressividade de alguns CBCs foi relacionada a certas características, como tamanho, tempo de evolução, localização perineural e padrão histopatológico do tumor, mas não há uma definição se fatores biológicos intrínsecos predispõe a este comportamento mais agressivo ou se o mesmo seria conseqüência de manejo inadequado. (Dubin *et al*, 1983. Silverman *et al*, 1992).

A identificação destes tipos de CBC requer um tratamento mais agressivo para minimizar o risco de recidiva. CBCs recorrentes costumam ter taxas de cura inferior aos CBCs primários, que têm taxa de cura de 90% ou mais em 5 anos, quando tratados adequadamente. (Kerkela e Saarialho, 2003).

Não existe um consenso sobre a classificação dos CBCs. Já foram descritos 26 subtipos desta neoplasia. (Wade *et al*, 1978). De acordo com Darrel *et al*, 2008), a classificação é a seguinte:

a) Nodular: tipo mais comum. Corresponde a cerca de 60% dos casos de CBCs primários. Caracteriza-se, clinicamente, como uma pápula ou nódulo translúcidos, com telangiectasias e predileção pela face (figura 1). Existe uma variante pigmentada. Com o tempo, a lesão pode ulcerar, aumentar de tamanho e estender-se em profundidade, destruindo estruturas da face como nariz, pálpebra e pavilhões auriculares. Lesões maiores podem ter a ulceração e destruição local como características dominantes, retardando o diagnóstico. O diagnóstico diferencial deve ser realizado com nevos intradérmicos, melanoma (amelanótico ou não, na variante pigmentada) e tumores benignos de anexos cutâneos. O CBC nodular caracteriza-se, histopatologicamente, como um tumor sólido. São observadas massas nodulares de células basalóides que estendem-se para dentro da derme (figura 2). Pode ser formado um característico artefato de separação entre o tumor e o estroma que se apresenta delicado, especializado, algo mixóide. As células tumorais possuem um

grande núcleo oval e alongado (semelhante aos núcleos das células basais da epiderme) e relativamente pouco citoplasma. Não há pontes intercelulares.

b) cístico: tem aparência azul-acinzentada, com transudato claro quando drenado (figura 3). Quando localizado na pálpebra pode ser confundido com um hidrocistoma. Nem sempre a degeneração cística é percebida clinicamente, por este motivo pode ser indistinguível do CBC nodular. Histopatologicamente é semelhante ao CBC nodular, com padrão sólido, mas com espaços císticos intratumorais (figura 4).

c) Superficial: corresponde a cerca de 30% dos casos de CBCs. Comumente apresenta-se como uma placa eritematosa, infiltrada e/ou descamativa (figura 5). Existe uma variante pigmentada. O diagnóstico diferencial deve ser realizado com CEC superficial, ceratose actínica ou mesmo lesões inflamatórias benignas. É mais freqüente no tronco e em extremidades. Lesões múltiplas podem ser observadas. O padrão de crescimento é predominantemente horizontal, mas podem se tornar invasivos. Pode ocorrer recidiva após remoção cirúrgica quando houver disseminação lateral subclínica. Histopatologicamente, apresenta brotamentos e proliferações irregulares de células basalóides formando uma paliçada periférica ligada à superfície inferior da epiderme e penetrando ligeiramente para dentro da derme (figura 6). Geralmente um

número grande de fibroblastos estão dispostos em torno das proliferações de células tumorais. Um infiltrado inflamatório crônico inespecífico, em quantidade branda ou moderada, está presente na derme superior.

d) Esclerodermiforme: corresponde a 5 a 10% dos casos de CBCs. O nome deste tipo de CBC deriva de sua característica clínica ser semelhante a lesão cutânea da esclerodermia. Caracteriza-se por uma lesão atrófica ou plana infiltrada, em placas ou pápulas, com bordas não definidas (figura 7). O tamanho do tumor geralmente é maior do que o observado clinicamente. Sua coloração pode ser eritematosa ou cor da pele e eventualmente há telangiectasias adjacentes. Pode se difícil diferenciar de uma lesão cicatricial. A histopatologia mostra numerosas pequenas ilhas de CBC, inclusas em estroma fibrótico, que geralmente infiltram a derme reticular (figura 8).

e) Carcinoma basoescamoso ou carcinoma metatípico: tem características histológicas basalóides, bem como características escamosas eosinofílicas do CEC. É mais agressivo, tem incidência de 9 a 10% de metástases.

f) Carcinoma micronodular: termo histopatológico utilizado quando o tumor apresenta pequenas ilhas tumorais infiltrando a derme (figura 9). Costumam ter comportamento destrutivo, disseminação

subclínica e maior taxa de recorrências. Apresenta-se como máculas, pápulas ou placas discretamente elevadas, com diagnóstico diferencial difícil com o CBC nodular.

g) Fibroepitelioma de Pinkus: variante do CBC que faz diagnóstico diferencial com o melanoma amelanótico, principalmente. A lesão costuma apresentar-se como uma placa ou nódulo eritematosos no dorso, por vezes pedunculados (figura 10). Histopatologicamente tem características típicas: um tumor superficial, bem demarcado na sua margem inferior, composto por longos e finos filamentos ramificados de CBC, inclusos em estroma fibroso (figura 11).

1.1.2 As Metaloproteinases da Matriz e os Seus Inibidores Teciduais

A derme é a porção da pele localizada entre a epiderme e a hipoderme. Entre suas principais funções estão a de proteção aos impactos externos, termorregulação, suprimento nutricional à epiderme e sensopercepção. (Bergstresser e Costner, 2008).

O limite entre epiderme e derme consiste de um conjunto especializado de moléculas de adesão coletivamente conhecido como zona da membrana basal. (Bergstresser e Costner, 2008)

A derme é composta por uma substância gelatinosa, amorfa, mucopolissacarídica, entrelaçada com fibras de origem protéica e colágena, por proteínas que retém água (proteoglicanas), por estruturas

vasculares, nervos e células de diferentes linhagens (mastócitos, macrófagos, fibroblastos, células dendríticas e estruturas glandulares e do aparelho pilosebáceo). (Mcgrath *et al*, 2005).

O colágeno é seu maior constituinte (representa 75% do peso seco e 18 a 30% do volume do derma) e a elastina, em segundo lugar, é responsável por sua elasticidade. O colágeno compreende, na realidade, uma família de proteínas semelhantes entre si, mas geneticamente distintas. São reconhecidos 36 genes que codificam 21 tipos de colágeno.

Dezesseis destes tipos estão presentes de forma relevante no tegumento cutâneo: I, III, IV, V, VI, VII, VIII, XII, XIII, XIV, XV, XVI, XVII, XVIII, XIX, XX.

O colágeno tipo I representa 80% do colágeno dérmico, o tipo III representa 10%, o tipo IV é constituinte das membranas basais, o tipo V têm importância na migração das células epidérmicas, os tipos VI e VII possuem papel de ancoragem, o tipo VIII confere estabilidade estrutural às células endoteliais, o tipo XII auxilia na modulação da capacidade de deformabilidade da matriz extracelular, o tipo XIII integra as junções de aderência, o tipo XVII é uma proteína transmembrana presente nos hemidesmossomos.). (Mcgrath *et al*, 2005).

As fibras elásticas são responsáveis pela elasticidade da pele. São constituídas por substância amorfa e por microfibrilas. (Bruckner-Tuderman *et al*, 2003).

Os proteoglicanos, macromoléculas compostas por ligações covalentes de proteínas com cadeias de carboidratos, promovem a conexão e o ajuste entre os vários constituintes dérmicos. São responsáveis pela organização do citoesqueleto.). (Mcgrath *et al*, 2005).

Em condições patológicas, o fenótipo e a função das células dérmicas mudam substancialmente. Em geral, a composição do infiltrado celular reflete a entidade patológica específica.). (Mcgrath *et al*, 2005).

As metaloproteinases da matriz (MMPs) são enzimas zinco-dependentes, do grupo das proteases. Possuem atividade proteolítica que contribui para o remodelamento tecidual fisiológico e patológico da matriz extracelular e das membranas basais. São secretadas por células residentes da epiderme e derme (queratinócitos, fibroblastos, histiócitos e mastócitos) a partir da indução mitocondrial. (Chebassier *et al*, 2004; Pozo *et al*, 2005).

Contribuem para o remodelamento tecidual normal e patológico, possuem ação na migração celular e agem como reguladoras nos mecanismos de processamento de citocinas, fatores de crescimento e moléculas de adesão. Estas funções são essenciais para a manutenção da morfogênese, angiogênese e nos processos de cicatrização. (Kerkela e Saarialho, 1997 e 2003).

As alterações da secreção ou regulação destas enzimas podem alterar o equilíbrio extracelular da derme e contribuir para o

desenvolvimento de processos patogênicos, inclusive neoplásicos. (Snarskaia *et al*, 2005; Carpena *et al*, 2007).

As MMPs diferem estruturalmente entre si e cada uma apresenta determinada habilidade para degradar um grupo de proteínas da matriz extracelular. Atualmente há nove grupos descritos: colagenases, gelatinases, estromalinas, matrilisinas, MMPs ativadas por furinas, MMPs transmembrana, MMPs transmembrana tipo II, MMPs transmembrana com domínio GPI, outras metaloproteinases. Vinte e quatro enzimas são descritas em seres humanos (quadro 1). Juntas, podem degradar todos os tipos de proteína da matriz extracelular. (Carpena *et al*, 2008).

A regulação da expressão e da ação destas enzimas é realizada por citocinas, fatores de crescimento, interações epiderme-derme, ativação de sua forma pró-enzima (as MMPs são secretadas sob forma inativada) e presença ativa dos seus inibidores naturais (TIMPs).

O quadro 1 descreve os grupos de metaloproteinases e as enzimas descritas em seres humanos. (Carpena *et al*, 2008).

Proteína	MMP
Colagenases	
Colagenase 1	MMP-1
Colagenase 2	MMP-8
Colagenase 3	MMP-13
Gelatinases	
Gelatinase A	MMP-2
Gelatinase B	MMP-9
Estromalisinas	
Estromalisina 1	MMP-3
Estromalisina 2	MMP-10
Matrilisinas	
Matrilisina 1	MMP-7
Matrilisina 2	MMP-26
MMPs ativadas por furinas	
Estromalisina 3	MMP-11
Epilisina	MMP-28
MMP-21	
MMPs transmembrana	
MT 1-MMP	MMP-14
MT 2-MMP	MMP-15
MT 3-MMP	MMP-16
MT 5-MMP	MMP-24
MMPs transmembrana tipo II	
MMP 23 A	
MMP 23 B	
MMPs transmembrana com domínio GPI	
MT 4-MMP	MMP-17
MT 6-MMP	MMP-25
Outras MMPs	
Metaloelastase	MMP-12
MMP 19	
Enamelisina	MMP-20
MMP-27	

A família de genes destas enzimas consiste, atualmente, em 21 membros dispersos pelo genoma com um agrupamento destes genes no cromossomo 11. (Kerker *et al*, 2003).

As gelatinases consistem no grupo de maior reconhecimento de suas atividades patogênicas. As representantes deste grupo são as gelatinases A e B ou metaloproteinases tipo 2 (MMP-2) e 9 (MMP-9), respectivamente. (Carpena *et al*, 2007).

A expressão das gelatinases varia de acordo com o tipo de célula estudada. Fisiologicamente, são secretadas por células inflamatórias, queratinócitos e fibroblastos participando de processos como remodelamento cicatricial e de cicatrização. (Seltzer *et al*, 2003). Degradam o colágeno desnaturado (gelatina), colágeno nativo tipo I, V, VI e X. Tem componentes das membranas basais (colágeno tipo IV, lamilina e fibronectina) como principais substrato. (Chen *et al*, 2005). Por degradarem estes substratos, também exercem importantes ações em situações patológicas que necessitem degradação das membranas basais e da matriz extracelular para a migração celular, como na invasão tumoral. (Esparza *et al*, 1999; Lauer-Fields *et al*, 2003). Nesta situação, as linhagens celulares podem aumentar a expressão das gelatinases, co-estimuladas por agentes efetores (oncogenes, citocinas). As gelatinases também podem ser secretadas por células tumorais e macrófagos. (Nagase *et al*, 1999. Esparza *et al*, 1999. Canavesi *et al*, 2004).

As próprias MMPs podem, através de um mecanismo autócrino, influenciar suas expressões, transformando as pró-formas das citocinas em formas ativas. (Kobayashi *et al*, 2005).

A expressão das gelatinases pode ser inibida pela expressão dos inibidores de metaloproteinases (TIMPs). O equilíbrio entre a expressão das MMPs e seus TIMPs determina a atividade proteolítica em processos fisiológicos e patológicos. (Ribeiro *et al*, 2008).

As gelatinases desnaturam um perfil semelhante de componentes protéicos da matriz, mas foi observado que a MMP-2 é duas vezes mais potente para a ação do colágeno tipo I, enquanto a MMP-9 digere o colágeno tipo IV duas a três vezes mais rápido que a MMP-2. (Xia *et al*, 2006).

A MMP-2 parece ser a enzima responsável pela degradação completa do colágeno após a clivagem pela colagenase intersticial. Digere o colágeno em velocidade superior a cem vezes a colagenase intersticial. É sintetizada e secretada como uma pró-enzima e a maior parte de seu processo de ativação ocorre em nível pós transcricional (proteico). Pode se auto-ativar, mas acredita-se que sua via de ativação mais importante seja através da ligação com a metaloproteinase tipo membrana 1 (MT1-MMP). (Seltzer *et al*, 2003).

In vitro, foi observado que a adição de TIMP-1 tem a capacidade de diminuir a produção e a ativação da MMP-2. (Geiler *et al*, 1997. Nguyen *et al*, 1998).

A MMP-9 é produzida por leucócitos polimorfonucleares e células epidérmicas humanos. É fortemente regulada através de um mecanismo transcripcional. Fatores de crescimento, citocinas, moléculas de adesão célula-célula e célula-MEC são importantes agentes conhecidos em seu controle. Digere o colágeno tipo IV duas ou três vezes mais rapidamente que a MMP-2. (Ribeiro *et al*, 2007).

In vitro, foi observado que a adição de TIMP-2 tem a capacidade de diminuir a produção e a ativação da MMP-9. (Geiler *et al*, 1997. Nguyen *et al*, 1998).

1.1.3 As Metaloproteinases da Matriz e o Carcinoma Basocelular

É reconhecido que raramente os CBCs apresentam comportamento agressivo, porém o seu crescimento tumoral pode apresentar graus variáveis de invasibilidade.

Na progressão tumoral, o desequilíbrio entre as MMPs e seus inibidores teciduais (TIMPs) parece ser fundamental para a degradação da matriz extracelular; a qual poderia viabilizar a invasibilidade e a agressividade destes tumores.

A expressão das MMP-s 3, 7, 10, 12 e 13 e do TIMP-3 foi observada no epitélio de CBCs e a expressão das MMP-s 1, 2, 3, 9, 11, 12 e 14 e dos inibidores TIMP-s 1, 2 e 3 foi observada no estroma destes tumores. (Kerkela *et al*, 2003).

Quando a expressão das MMPs em CBCs é comparada com a expressão nos carcinomas epidermóides, é constatado que os carcinomas epidermóides têm uma expressão mais abundante de MMPs no compartimento epitelial. (Kerkela *et al*, 2003).

Há um estudo que avaliou a expressão das MMPs 2 e 9 e de seus inibidores naturais TIMP-1 e TIMP-2 em 30 casos de CBCs. (Ribeiro *et al*, 2008). Os autores sugeriram a realização de novos trabalhos para a avaliação do comportamento biológico destes tumores e sua relação com estas enzimas, diante da amostragem pequena avaliada, a qual não teria sido suficiente para evidenciar uma relação entre os marcadores utilizados e os CBCs.

Outros trabalhos avaliaram a expressão das MMPs nos CBCs, mas faltam dados sobre a relação desta expressão com o tipo histológico do tumor. (Varani *et al*, 2000; Kerkela e Saarialho, 2003; Maciel *et al*, 2008)

A relação da expressão das gelatinases nos CBCs e, particularmente, suas relações com os subtipos deste tumor, torna-se importante na medida em que o reconhecimento de marcadores para neoplasias mais agressivas podem direcionar a escolha por terapêuticas com maior poder resolutivo.

1.2 Referências Bibliográficas

American Cancer Society. Cancer facts and figures 2000. Disponível em: www.cancer.org. 2001. Accessed November 2008

Arranz FR, Rubio JFP, Salvado MMV, Sordo VV. Descriptive epidemiology of basal cell carcinoma and cutaneous squamous cell carcinoma in Soria (north-eastern Spain) 1998-2000: a hospital-based survey. *J EAVD* 2004;18:137-141.

Bergstresser PR, Costner M. "Anatomy and Physiology." *Dermatology*, 2nd Ed. Eds. Jean Bolognia *et. al.* Mosby, 2008. p. 25-35.

Bonamigo RR, Bakos L, Edelweiss M, Cartell A. Could matrix metalloproteinase-9 be a link between *Demodex folliculorum* and rosacea? *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2005 Sep;19(5):646-7.

Boonchai W, Green A, Ng J ET al. Basal cell carcinoma in chronic arsenicism occurring in Queensland, Australia, after ingestion of an asthma medication. *J Am Acad Dermatol* 2000; 43-664

Boyd AS, Shyr Y, King LE Jr. Basal cell carcinoma in young women: an evaluation of the association of tanning bed use and smoking. *J Am Acad Dermatol* 2002; 46-706

Bruckner-Tuderman L. Biology of extracellular Matrix. In: Bolognia JL, Jorizzo JL, Rapini RP, editors. *Dermatology*. First Ed. London: Mosby; 2003. p. 1483-96

Christenson LJ, Borrowman TA, Vachon CM, Tollefson MM, Otley CC, Weaver AL, Roenigk RK. Incidence of Basal Cell and Squamous Cell Carcinomas in a Population Younger Than 40 Years. *JAMA*. 2005; 294:681-690.

Canavesi M, Baldini N, Leonardi A, Sironi G, Bellosta S, Bernini F. In vitro inhibitory effect of lercanidipine on cholesterol accumulation and matrix metalloproteinases secretion by macrophages. *J Cardiovasc Pharmacol* 2004;44(4):416-22.

Carpina ABP, Francisco AAM, Bonamigo RR. As metaloproteinases-2 e -9 da matriz e o carcinoma espinocelular: uma análise da literatura. *Med Cutan Iber Lat Am* 2008;36(6):285-290

Chebassier N, El Houssein O, Viegas I, Dreno B. In vitro induction of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 expression in keratinocytes by boron and manganese. *Exp Dermatol* 2004;13(8): 484-90.

Chen F, Eriksson P, Hansson GK, Herzfeld I, Klein M, Hansson LO ET al. Expression of matrix metalloproteinase 9 and its regulators in the unstable coronary atherosclerotic plaque. *Int J Mol Med* 2005;15(1):57-65.

Chuang TY, Popescu A, Su WP, Chute CG. Basal cell carcinoma. A population based incidence study in Rochester, Minnesota. *J Am Dermatol* 1990; 22:413

Dennis LK, Freeman LEB, VanBeek MJ. Sunscreen use and the risk for melanoma; A QUANTITATIVE REVIEW. *Ann Intern Med* 2003: 139-966

Dubin N, Kopf AW. Multivariate risk score for recurrence of cutaneous basal cell carcinomas. *Arch Dermatol* 1983; 119:373

Esparza J, Vilardell C, Calvo J, Juan M, Vives J, Urbano-Marquez A ET al. Fibronectin upregulates gelatinase B (MMP-9) and induces coordinated expression of gelatinase A (MMP-2) and its activator MT1-MMP (MMP-1) by human T lymphocyte cell lines. A process repressed through RAS/MAO kinase signaling pathways. *Blood* 1999;94(8):2754-66.

Euvrard S, Kanitakis J, Claudy A. Skin cancers after organ transplantation. *N Engl J Med* 2003;348:1681

Fine JD, Johnson LB, Weiner M e cols. Epidermolysis bullosa and the risk of life-threatening cancers: the National EB Registry experience, 1986-2006. *J Am Acad Dermatol* 2009; 60:203

Fitzpatrick TB, Eisen AZ, Wolff K, Freedberg IM, Austen KF. In: *Dermatology in General Medicine*. McGraw-Hill, 1999, vol 2, pág. 2274-2292

Gómez De, Alonso DF, Yoshiji H, Thorgeirsson UP. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol* 1997;74:111-22.

Green A, Battistutta D, Hart V e cols. Skin cancer in a subtropical Australian Population: incidence and lack of association with occupation. The Nambour Study Group. *Am J Epidemiol* 1996; 144-1034

Green A, Williams G, Neale R e cols. Daily sunscreen application and betacarotene supplementation in prevention of basal-cell and squamous-

cell carcinomas of the skin: a randomized controlled trial. *Lancet* 1999; 354-723

Hannuksela-Svahn A, Pukkala E, Karnoven J. Basal cell skin carcinoma and other non-melanoma skin cancer in Finland from 1956 through 1995. *Arch Dermatol* 1999; 135-781

INCA (2010). Estimativa 2010, Incidência do Câncer no Brasil. Acesso em 14/03/10, em: http://www.inca.gov.br/estimativa/2010/index.asp?link=tbregioes_consolidado.asp&ID=1

Kahari VM, Saarialho-kere U. Matrix metalloproteinases in skin. *Exp Dermatol* 1997 Oct;6(5):199-213.

Karagas MR, McDonald JA, Greenberg ER e cols. Risk of basal cell and squamous cell skin cancers after ionizing radiation therapy. For the skin Cancer Prevention Study Group. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88:1848

Karagas MR, Tosteson TD, Blum J e cols. Design of an epidemiologic study of drinking water arsenic exposure and skin and bladder cancer risk in U.S. population. *Environ Health Perspec* 1998; 106 suppl 4-1047.

Kerkela E, Saarialho-Kere U. Matrix metalloproteinases in tumor progression: focus on basal and squamous cell skin cancer. *Exp Dermatol* 2003 Apr;12(2):109-25.

Lauer-Fields JL, Sri tharan T, Stack MS, Nagase H, Fields GB. Selective hydrolysis of triple-helical substrates by matrix metalloproteinase-2 and -9. *J Biol Chem* 2003;278(20): 18140-5

Lichter MD, Karagas MR, Mott LA e cols. Therapeutic ionizing radiation and the incidence of basal cell carcinoma and squamous cell carcinoma. The new Hampshire Skin Cancer Study Group. *Arch Dermatol* 2000;136:1007

Macgrath JA, Eady RAJ, Pope FM. Anatomy and organization of human skin. In: Burns T, Breathnach S, Cox N, Griffiths C, editors. *Rook's Textbook of Dermatology*. Seventh ed. Oxford: Blackwell Publishing; 2005.p. 3.1-84

Mittelbronn MA, Mullins DL, Ramos-Caro FA, Flowers FP. Frequency of pre-existing actinic keratosis in cutaneous squamous cell carcinoma. *Int J Dermatol* 1998;37:677-681.

Nagase H, Woessner JF Jr. Matrix Metalloproteinases. *J Biol Chem* 1999;274:21491-4.

Naylor MF, Boyd A, Smith DW e cols. High Sun protection factor sunscreens in the suppression of actinic neoplasia. Arch Dermatol 1995; 131-170

Pozo P, Valenzuela MA, Melej C, Zaldivar M, Puente J, Martinez B ET al. Longitudinal analysis of metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases and clinical parameters in gingival crevicular fluid from periodontitis-affected patients. J Periodontal Res 2005;40(3):199-207.

Ramsay HM, Fryer AA, Hawley CM e cols. Factors associated with nonmelanoma skin cancer following renal transplantation in Queensland, Austrália. J Am Acad Dermatol 2003; 49-397

Reizner GT, Chuang TY, Elpern DJ e cols. Basal cell carcinoma in Kuai, Hawaii the highest documented incidence in the United States. J Am Acad Dermatol 1993; 29-184

Ribeiro RIMA, Borges JR PC, Cardoso SV, Candelori I, Espíndola FS, Cassali GD, Loyola AM. Expressão de metaloproteinases de matriz e seus inibidores teciduais em carcinomas basocelulares. J Bras Patol Med Lab • v. 44 • n. 2 • p. 115-121 • abril 2008

Seltzer JL, Eisen AZ. The role of extracellular matrix metalloproteinases in connective tissue remodeling. In: Freedberg IM, Eisen AZ, Wolff K, Austen KF, Goldsmith LA, Katz SL, editors. Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine. Sixth ed. New York: McGraw-Hill; 2003. P 200-9.

Silverman MK, Kopf AW, Bart RS e cols. Recurrence rates of treated basal cell carcinomas. Part 3: Surgical excision. J Dermatol Surg Oncol 1992;18-471

Snarskaia ES, Molochkov VA, Frank GA, Zavalishina LA. Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in basal cell and metastatic cancer of the skin Arkh Patol 2005 May-Jun;67(3):14-6.

Stern RS, Liebman EJ, Vakeva L. Oral psoralen and ultraviolet-A light (PUVA) treatment of psoriasis and persistent risk of nonmelanoma skin cancer. PUVA follow-up study. J Natl Cancer Inst 1998; 90:1278

Tao SS, Bolger PM. Dietary arsenic intakes in the United States: FDA Total dietary study, September 1991-december 1996. Food Addit Contam 1999; 16-465

Varani J, Hattori Y, Chi Y, Schmidt T, Perone P, Zeigler ME, Fader DJ,

Johnson TM. Collagenolytic and gelatinolytic matrix metalloproteinases and their inhibitors in basal cell carcinoma of skin: comparison with normal skin. *British Journal of Cancer* (2000) 82, 657–665. doi:10.1054/bjoc.1999.0978 www.bjcancer.com Published online 7 January 2000.

Wade TR, Ackerman AB. The many faces of basal cell carcinoma. *J Dermatol Surg Oncol* 1978; 4: 23–28.

Xia T, Akers K, Eisen AZ, Seltzer JL. Comparison of cleavage site specificity of gelatinase A and B using collagenous peptides. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1293(2): 259-66.

2.1 Objetivo Principal

Avaliar a expressão imunoistoquímica das metaloproteinases da matriz (MMP-2 e MMP-9) e dos seus inibidores teciduais (TIMP-1 e TIMP-2) nos carcinomas basocelulares.

2.2 Objetivo secundário

a) Verificar se há relação preferencial entre a expressão imunoistoquímica da MMP-2, da MMP-9, da TIMP-1 e da TIMP-2 com determinados subtipos de carcinoma basocelular.

Title: Metalloproteinases 2 & 9 and their inhibitors in basal cell carcinomas.

Authors: Sabrina De Stefani, Adriana Vial Roehe, Renan Rangel Bonamigo

Institution: Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA).

Address for correspondence: Rua Coronel André Belo, 476 / 505, Porto Alegre, RS, Brazil.

Telephone: 55 (51) 99789478, fax: 55 (51) 33789850.

email: sabrinadss@gmail.com

A ser submetido ao Journal of Cutaneous Pathology

Background: matrix metalloproteinases (MMPs) may participate in tumor invasiveness, and the histopathological types of basal cell carcinomas (BCCs) differ from each other as to tendency to invasiveness and recurrence. The immunohistochemical expression of MMP-2 and MMP-9 and their natural inhibitors, TIMP-1 and TIMP-2 was evaluated in the different types of basal cell carcinomas. Method: cross-sectional study evaluating age, sex, histological type, location of the tumor and immunohistochemical expression of MMP-2 and -9 and of TIMP-1 and TIMP-2, in 72 samples of basal cell carcinomas. Results: mean age was 57.9 years and 51.5% were male. The expression of the MMPs-2 and -9 and their natural inhibitors was broadly and similarly distributed among the different histopathological types of BCCs. Tendencies with no statistical significance were found for a lower expression of TIMP-1 in the sclerodermiform and infiltrated carcinomas, and among the expressions of MMP-2 and of TIMP-1, and of MMP-9 and TIMP-2 in the tumor cells of the sclerodermiform and infiltrative types. Conclusions: in a sample with 72 cases of basal cell carcinomas, there was no proof of relevant associations between the MMPs, their inhibitors and the types of BCCs, even though imbalances were observed in immunohistochemical expression between the MMP-2 and -9, and their inhibitors in sclerodermiform and infiltrative type basal cell carcinomas.

Key words: metalloproteinases, gelatinases, carcinomas

Approximately 80% of non melanoma skin neoplasms are basal cell carcinomas (BCCs). (Ribeiro *et al*, 2008). According to data from the National Cancer Institute (INCA- Instituto Nacional do Câncer), the estimated number of new cases of non melanoma skin neoplasms in Brazil in 2010 is 113 850. (Estimativa 2010, Incidência do Câncer no Brasil. Acess in 03/14/10 in: http://www.inca.gov.br/estimativa/2010/index.asp?link=tbregioes_consolidado.asp&ID=1).

These tumors (BCCs) generally grow slowly, are locally destructive and rarely metastatic. (Fitzpatrick *et al*, 1999).

BCCs cause very low mortality rates, but there is a potentially major impact on the personal sphere and on the Health Services that provide treatment for the patients. (Fitzpatrick *et al*, 1999).

The histological types of basal cell carcinoma present intrinsically different biological behaviors. Thus, for instance, the superficial type is not very invasive (but can be highly recurrent, if multicentric), and the sclerodermiform and infiltrated types are the most invasive and recurrent, with more aggressive behavior. (Fitzpatrick *et al*, 1999)

Matrix metalloproteinases (MMPs) are enzymes belonging to the protease group, with proteolytic activities that contribute to the physiological and pathological tissue remodeling of the extracellular matrix and the basement membranes (Chebassier *et al*, 2004. Pozo *et al*, 2005). They are

secreted by resident epidermal cells (particularly keratinocytes) and dermal cells (fibroblasts, histiocytes and mastocytes), beginning with mitochondrial induction. (Kahari VM and Saarialho-kere U, 1997). Changes in the secretion or regulation of these enzymes may alter the extracellular balance of the dermis and contribute to the development of pathogenic processes, including neoplastic ones. (Gómez De *et al*, 1997). The two types of MMPs with pathogenic participation that have been most investigated in cutaneous neoplasias are type IV collagenases, also recognized as gelatinases (A or matrix metalloproteinase-2 and B or matrix metalloproteinase-9) (Seltzer JL and Eisen AZ, 2003. Carpena *et al*, 2007).

Gelatinase expression can be inhibited by the expression of the inhibitors of metalloproteinases (TIMPs). The balance between the expression of MMPs and their TIMPs determines proteolytic activity in physiological and pathological processes. TIMP-1 can diminish production and activation of MMP-2, and TIMP-2 can reduce production and activation of MMP-9. (Bruckner-Tuderman L, 2003. Ribeiro *et al*, 2008)

Prior studies evaluated the expression of MMPs in the BCCs, but no conclusive data are available about the relationship between this expression and the histological types of the tumor. (Kerkela e Saarialho, 2003; Maciel *et al*, 2008, Ribeiro *et al*, 2008; Varani *et al*, 2000).

The purpose of this study was to evaluate the relationship between the immunohistochemical expression of MMP-2, MMP-9 and TIMP-1 and TIMP-2 and the histological types of BCCs.

The Committee of Ethics in Research at the Universidade Federal de Ciências da Saúde (UFCSPA) approved this research project (project number 378/98).

In a cross-sectional study tissue samples from (incisional and excisional) skin biopsies (skin with hypoderma) were evaluated, diagnosed as basal cell carcinoma, selected consecutively in a Pathology Laboratory (LABSUL) in the city of Porto Alegre (Brazil), during 2007. The slides were later reviewed and submitted to the immunohistochemistry technique in the laboratory of the Graduate Program of Pathology at UFCSPA.

Cases without a histopathological report determining the histological type of basal cell carcinoma, cases of mixed basal cell carcinoma (two histopathological types of basal cell carcinoma in the same tumor), cases that did not include hypoderma and those in which there had been an association between basal cell carcinoma and epidermoid carcinoma in the same tumor lesion were excluded.

The variables studied were the immunohistochemical expression of MMP-2 and MMP-9 and their natural inhibitors TIMP-1 and TIMP-2 (dependent variables), age, sex, tumor site and histological type of basal cell carcinoma (independent variables). The histological sections were deparaffined, hydrated and then submitted to antigenic recovery using EDTA buffer solution. The peroxidase and biotin activity was blocked. The

samples were then incubated with the primary antibodies (clones Ab-4 anti-MMP-2, 1:800; Ab-3 anti MMP-9, 1:2000; Ab-2 anti TIMP-1, 1:600; and Ab-2 anti TIMP-2) for 18 hours, at ambient temperature. The reaction was amplified using the avidin-biotin-peroxidase system. The reaction was revealed using 3 α diaminobenzidine tetrahydrochloride. The tissue fragments were then counter-stained in Harris hematoxylin.

The expression of MMP-2 and MMP-9, of TIMP-1 and TIMP-2 in the slides was analyzed immunohistochemically using the qualitative method described in the literature. (Bonamigo *et al*, 2005), where: (0) means absence of expression (no brown color); (F) weak expression (light brown color); (I) intense expression (dark brown color). The stroma and the tumor cells were evaluated. The slides were evaluated by a pathologist (AR), with experience in the study of immunohistochemistry and metalloproteinases.

As to statistical analysis: the general results are presented by the distribution of simple and relative frequencies. The evaluation of the associations used chi-square, and the McNemar test was used to compare the number of cases observed independently (proportions). The data were evaluated using software SPSS 13.0 (Statistical Package for Social Sciences for Windows). The level of significance (α) of 5% (p 0.05) was adopted for decision criteria.

General characterization of the sample

Seventy-two individuals with basal cell carcinoma were studied. The mean age of the patients was 57.9 years (SD=16.1 years), and 51.5% (n=35) were male. Excisional biopsy was performed in 61.1% (n=44) and incisional in 38.9% (n=28), with $\chi^2_{\text{calc}}=3.556$; $p=0.059$.

Grouping the BCC types, the final classification was 69.4% (n=50) solid, 20.8% (n=15) superficial and 9.7% (n=7) sclerodermiform and infiltrative. The proportion of carcinomas classified as solid proved significantly higher in this sample ($\chi^2_{\text{calc}}=43.583$; $p<0.001$).

Topographically, there was a significant predominance ($\chi^2_{\text{calc}}=44.839$; $p<0.001$) of the location on the face, with 43.5% (n=27) and on the chest, with 27.4% (n=17).

Table 1 illustrates the data discussed above.

Table 1. General characteristics of the sample, with central tendency and variability measures.

Variables	n=72 f (%)**
Age (years)	
Mean \pm standard deviation	57.9 \pm 16.1
Minimum – maximum	28 – 90
Sex NI=4 (5.6%)*	
Male	35 (51.5)
Female	33 (48.5)
Types of BCC	
Superficial	15 (20.8)
Solid***	50 (69.4)
Sclerodermiform and infiltrative	7 (9.7)
Biopsy/Excision	
Biopsy	28 (38.9)
Excision	44 (61.1)
Site NI=10 (13.9)*	
Face****	27 (43.5)
Upper limbs	4 (6.5)
Lower limbs	3 (4.8)
Chest*****	17 (27.4)
Cervical region	5 (8.1)
Not mentioned (skin)	6 (9.7)

*NI: number without information for the variable. **Values presented with absolute and percentage (%) numbers, with the percentage obtained over the total number of valid cases. *** $\chi^2_{\text{calc}}=43.583$; $p<0.001$. **** $\chi^2_{\text{calc}}=44.839$; $p<0.001$

The immunohistochemical expression of matrix metalloproteinases -2 and -9 and of the tissue inhibitors -1 and -2 was broadly present in the basal cell carcinomas, independently of histological type. Table 2 shows the expression of the antigens studied and the specific histological types of BCCs.

Table 2: MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2 and the histological type of BCC: immunohistochemical expression.

Variables	Type of BCC			P §
	Superficial (n=13)	Solid (n=50)	Sclerodermiform and infiltrative (n=7)	
MMP-2 Tumor NI=2				
Weak	7 (53,8)	32(64,0)	4 (57,1)	0,855
Strong	5 (38,5)	14(28,0)	2 (28,6)	
Negative	1 (16,7)	4 (66,7)	1 (16,7)	
MMP-2 Stroma NI=2				
Weak	8 (61,5)	34(68,0)	4 (57,1)	0,774
Strong	5 (38,5)	16(32,0)	3 (42,9)	
Negative	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	
MMP-9 Tumor NI=1				
Weak	9 (60,0)	22(44,9)	1 (14,3)	0,144
Strong	6 (40,00)	27(55,1)	6 (85,7)	
Negative	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	

MMP-9 Stroma NI=2				
Weak	8 (53,3)	17(35,4)	4 (57,1)	
Strong	7 (46,7)	30(62,5)	3 (42,9)	0,599
Negative	0 (0,0)	1 (2,1)	0 (0,0)	
TIMP-1 Tumor NI=4				
Weak	10 (71,4)	28(59,6)	4 (57,1)	
Strong	3 (21,4)	4 (8,5)	0 (0,0)	0,191
Negative	1 (7,1)	15(31,9)	3 (42,9)	
TIMP-1 Stroma NI=4				
Weak	8 (57,1)	21(44,7)	4 (57,1)	
Strong	6 (42,9)	23(48,9)	2 (28,6)	0,561
Negative	0 (0,0)	3 (6,4)	1 (14,3)	
TIMP-2 Tumor				
Weak	14 (93,3)	43(86,0)	5 (71,4)	
Strong	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (14,3)	0,176
Negative	1 (6,7)	7 (14,0)	1 (14,3)	
TIMP-2 Stroma				
Weak	12 (80,0)	38(76,0)	5 (71,4)	
Strong	3 (20,0)	8 (16,0)	2 (28,6)	0,830
Negative	0 (0,0)	4 (8,0)	0 (0,0)	

**NI: number without information for the variable*

As to the BCCs in general, weak expression predominated in the tumor cells, with 61.2% (n=41), followed by strong expression, with 29.9% (n=20) and absence of expression, with 9.0% (n=6). As to the stroma, it was observed that 65.7% (n=44) of the cases were classified as having weak expression, 34.3% (n=23) as strong and 0.0% (n=0) as having absence of expression.

There was not there were no statistically relevant differences between the expression of the MMP-2 and the specific histological types of BCCs.

MMP-9 in basal cell carcinomas

As to BCCs in general, in the tumor cells, 45.1% (n=32) had weak expression, 54.9% (n=39) strong, and no case had absence of expression. As to the stroma classifications, 58.6% (n=41) had weak expression, 10.0% (n=7) strong and 31.4% (n=22) of the cases did not express MMP-9.

There was not there were no statistically relevant differences between the expression of the MMP-9 and the specific histological types of BCCs.

As to BCCs in general, in the tumor cells, TIMP-1 expression was weak in 60.7% (n=34) of the cases, strong in 8.9% (n=5) and negative in 30.4% (n=17) of the cases. In the tumor cells, 50.0% (n=28) of the cases had weak expression, 42.9% (n=24) strong, and in 7.1% (n=4) there was no expression. In the stroma 76.4% (n=55) were classified as weak expression, 18.1% (n=13) as strong and 5.6% (n=4) as absence of expression

There was not there were no statistically relevant differences between the expression of the TIMP-1 and the specific histological types of BCCs.

TIMP-2 in basal cell carcinomas

As to the BCCs in general, in the tumor cells, 86.1% (n=62) of the cases were classified as being of weak expression, 1.4% (n=1) as strong and 12.5% (n=9) with absence of expression, while for the stroma, 76.4% (n=55) of the cases were classified as weak, 18.1% (n=13) as strong and 5.6% (n=4) as negative.

There was not there were no statistically relevant differences between the expression of the TIMP-2 and the specific histological types of BCCs.

Figures 1 and 2 are photos showing examples of immunohistochemical expression of the MMPs and TIMPs in basal cell carcinomas.

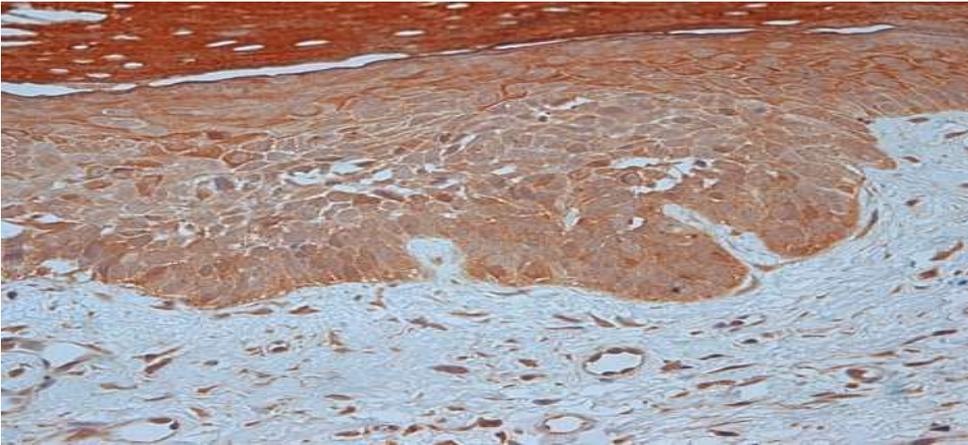


Figure 1: MMP-9 strong expression in tumor cells and stroma.

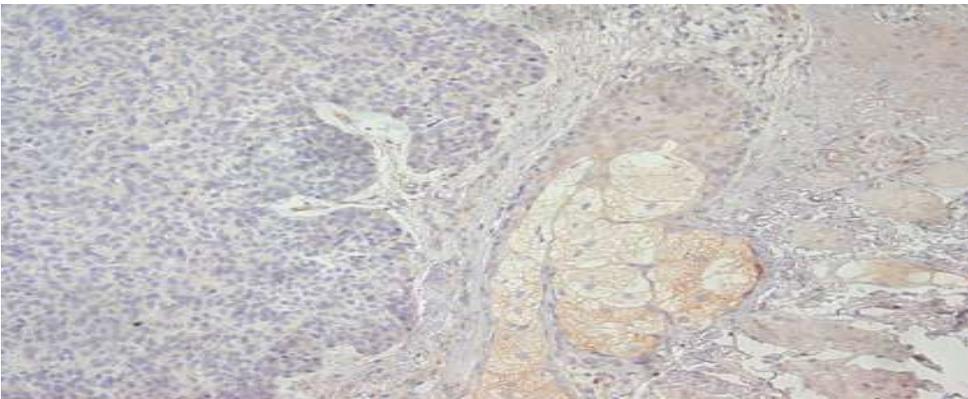


Figure 2: TIMP-2 weak expression in tumor cells and stroma.

This study looked at the immunohistochemical expression of gelatinases and their inhibitors in BCC biopsies. The distribution of independent variables is similar to that found in the literature, as is also the predominance of solid basal cell carcinomas. ($P < 0.01$). (American Cancer Society. Chuang TY, 1990. Arranz, 2004).

The vast majority of BCCs expressed gelatinases A and B and their inhibitors in the tumor cells and stroma, but publications on this subject are not homogeneous regarding details on the data found. (Ribeiro *et al*, 2008)

In this study, several specificities were found that can help understand the distribution of these gelatinases and their inhibitors in the different types of basal cell carcinomas.

It was found that MMP-2, which is generally defined as a matrix metalloproteinase that provides a great contribution to tumor invasiveness, was expressed similarly in the carcinoma considered least invasive (superficial), in the most frequent (nodular), and in the most invasive (sclerodermiform and infiltrative).

TIMP-1 expression was greater (but not statistically significant) in the tumor cells in the superficial BCCs (92.85%, with expression, 71.4% with weak expression and 21.4% with strong expression), compared to the sclerodermiform and infiltrative ones (57.1%, all with weak expression). These results may suggest less inhibition of the action of MMP-2 in these basocellular carcinomas.

A tendency was observed for the MMP-9 expression in tumor cells to be weak in the superficial BCC (60%) and strong in the sclerodermiform BCCs (85.7%). However, these associations were not significant ($p=0.144$).

As to TIMP-2, the analysis of its expression in the tumor cells and in the stroma showed a certain predominance of weak expression in all types of BCCs which appears to contrast with the predominance of the strong expression in the tumor cells of MMP-9 in the sclerodermiform and infiltrative BCCs, as shown in table 2. This context could favor further action of the MMP-9 in tumor pathogenesis, in particular in the sclerodermiform type. The small number of sclerodermiform and infiltrative BCC cases prevented a more consistent statistical analysis of these findings.

Although this is a larger number of samples than those described in most previously published studies on the subject, currently the limitation is probably the lack of proportion between the number of solid BCCs compared to the other types, particularly the sclerodermiform and infiltrative ones.

Conclusions

The immunohistochemical study of gelatinases A and B and their natural inhibitors in the different histological types of BCC shows a frequent

of the markers studied, and no demonstration of statistically significant associations with the 72 cases studied.

TIMP-2 showed a lower tendency to expression in the cases of sclerodermiform and infiltrative BCCs, and there may be an imbalance of the expression between MMP-2 and TIMP-1, and between MMP-9 and TIMP-2 in these more invasive types of BCC.

Larger studies, emphasizing sclerodermiform and infiltrative basal cell carcinomas should be encouraged to confirm this hypothesis, which has implications for prognosis and therapeutic management.

References

American Cancer Society. Cancer facts and figures 2000. Available at: www.cancer.org. 2001. Accessed November 2008

Arranz FR, Rubio JFP, Salvado MMV, Sordo VV. Descriptive epidemiology of basal cell carcinoma and cutaneous squamous cell carcinoma in Soria (north-eastern Spain) 1998-2000: a hospital-based survey. *J EAVD* 2004;18:137-141.

Bonamigo RR, Bakos L, Edelweiss M, Cartell A. Could matrix metalloproteinase-9 be a link between *Demodex folliculorum* and rosacea? *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2005 Sep;19(5):646-7.

Bruckner-Tuderman L. Biology of extracellular Matrix. In: Bologna JL, Jorizzo JL, Rapini RP, editors. *Dermatology*. First Ed. London: Mosby; 2003. p. 1483-96

Carpina ABP, Francisco AAM, Bonamigo RR. As metaloproteinases-2 e -9 da matriz e o carcinoma espinocelular: uma análise da literatura. *Med Cutan Iber Lat Am* 2008;36(6):285-290

Chebassier N, El Houssein O, Viegas I, Dreno B. In vitro induction of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 expression in keratinocytes by boron and manganese. *Exp Dermatol* 2004;13(8): 484-90.

Chuang TY, Popescu A, Su WP, Chute CG. Basal cell carcinoma. A population based incidence study in Rochester, Minnesota. *J Am Dermatol* 1990; 22:413

Estimativa 2010, Incidência do Câncer no Brasil. Acesso em 14/03/10, em: http://www.inca.gov.br/estimativa/2010/index.asp?link=tbregioes_consolidado.asp&ID=1).

Fitzpatrick TB, Eisen AZ, Wolff K, Freedberg IM, Austen KF. In: *Dermatology in General Medicine*. McGraw-Hill, 1999, vol 2, pág. 2274-2292

Gómez De, Alonso DF, Yoshiji H, Thorgeirsson UP. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol* 1997;74:111-22.

Kahari VM, Saarialho-kere U. Matrix metalloproteinases in skin. *Exp Dermatol* 1997 Oct;6(5):199-213.

Kerkela E, Saarialho-Kere U. Matrix metalloproteinases in tumor progression: focus on basal and squamous cell skin cancer. *Exp Dermatol* 2003 Apr;12(2):109-25.

Pozo P, Valenzuela MA, Melej C, Zaldivar M, Puente J, Martinez B ET al. Longitudinal analysis of metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases and clinical parameters in gingival crevicular fluid from periodontitis-affected patients. *J Periodontal Res* 2005;40(3):199-207.

Ribeiro RIMA, Borges JR PC, Cardoso SV, Candelori I, Espíndola FS, Cassali GD, Loyola AM. Expressão de metaloproteínas de matriz e de seus inibidores teciduais em carcinomas basocelulares. *J Bras Patol Med Lab* • v. 44 • n. 2 • p. 115-121 • abril 2008

Seltzer JL, Eisen AZ. The role of extracellular matrix metalloproteinases in connective tissue remodeling. In: Freedberg IM, Eisen AZ, Wolff K, Austen KF, Goldsmith LA, Katz SL, editors. *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine*. Sixth ed. New York: McGraw-Hill; 2003. P 200-9.

Varani J, Hattori Y, Chi Y, Schmidt T, Perone P, Zeigler ME, Fader DJ, Johnson TM. Collagenolytic and gelatinolytic matrix metalloproteinases and their inhibitors in basal cell carcinoma of skin: comparison with normal skin. *British Journal of Cancer* (2000) 82, 657–665. doi:10.1054/bjoc.1999.0978 www.bjcancer.com Published online 7 January 2000.

Título: Metaloproteinases 2 e 9 e seus inibidores, em carcinomas basocelulares.

Autores: Sabrina De Stefani, Adriana Vial Roehe, Renan Rangel Bonamigo

Instituição: Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA).

Endereço para correspondência: Rua Coronel André Belo, 476 / 505, Porto Alegre, RS, Brasil.

Telefone: 55 (51) 99789478, fax: 55 (51) 33789850.

email: sabrinadss@gmail.com

Background: as metaloproteinases da matriz (MMPs) podem participar da invasividade tumoral e os tipos histopatológicos de carcinomas basocelulares (CBCs) são diferentes entre si em relação à tendência a serem invasivos e recidivantes. Foram avaliadas a expressão imunohistoquímica da MMP-2 e da MMP-9 e de seus inibidores naturais, TIMP-1 e TIMP-2, nos diferentes tipos de carcinomas basocelulares. Método: estudo transversal que avaliou idade, sexo, tipo histológico, localização do tumor e expressão imunohistoquímica das MMP-2 e -9 e dos TIMP-1 e -2, em 72 amostras de carcinomas basocelulares. Resultados: a média das idades foi de 57,9 anos e 51,5% eram do sexo masculino. A expressão das MMPs-2 e -9 e de seus inibidores naturais foi distribuída amplamente nos diferentes tipos histopatológicos de CBCs. Foram verificadas tendências, sem significância estatística, para uma menor expressão da TIMP-1 nos carcinomas esclerodermiforme/infiltrativos e entre as expressões da MMP-2 e do TIMP-1 e da MMP-9 e do TIMP-2 nas células tumorais dos tipos esclerodermiformes/infiltrativos. Conclusões: em uma amostra com 72 casos de carcinomas basocelulares não houve comprovação de associações relevantes entre as MMPs, seus inibidores e os tipos de CBCs, ainda que tenham sido observados desequilíbrios na expressão imunohistoquímica entre as MMP-2 e -9 e seus inibidores em carcinomas basocelulares tipos esclerodermiformes/infiltrativos.

Palavras-chaves: metaloproteinases, gelatinases, carcinomas

Aproximadamente 80% das neoplasias cutâneas não melanoma são carcinomas basocelulares (CBCs). (Ribeiro *et al*, 2008). Segundo os dados do Instituto Nacional do Câncer do Brasil (INCA), o número de casos novos de câncer de pele não melanoma estimados para o Brasil em 2010 é de 113 850. (Estimativa 2010, Incidência do Câncer no Brasil. Acesso em 14/03/10, em: http://www.inca.gov.br/estimativa/2010/index.asp?link=tbregioes_consolidado.asp&ID=1).

Geralmente, estes tumores (CBCs) possuem crescimento lento, são destrutivos localmente e raramente são metastáticos. (Fitzpatrick *et al*, 1999).

Os índices de mortalidade ocasionados pelos CBCs são muito baixos, mas potencialmente há impacto importante na esfera pessoal e nos Serviços de Saúde que assistem terapêuticamente os pacientes. (Fitzpatrick *et al*, 1999).

Os tipos histológicos de carcinoma basocelular apresentam comportamentos biológicos intrinsecamente diferentes. Assim, por exemplo, o tipo superficial é pouco invasivo (mas pode ser muito recidivante, se multicêntrico) e o esclerodermiforme e o infiltrativo são os mais invasivos e recidivantes, possuindo comportamento mais agressivo. (Fitzpatrick *et al*, 1999).

As metaloproteinases da matriz (MMPs) são enzimas do grupo das proteases, com atividades proteolíticas, que contribuem para o remodelamento tecidual fisiológico e patológico da matriz extracelular e das membranas basais (Chebassier *et al*, 2004. Pozo *et al*, 2005).

São secretadas por células residentes da epiderme (particularmente os queratinócitos) e da derme (fibroblastos, histiócitos e mastócitos), a partir da indução mitocondrial. (Kahari VM e Saarialho-kere U, 1997)

As alterações da secreção ou regulação destas enzimas podem alterar o equilíbrio extracelular da derme e contribuir para o desenvolvimento de processos patogênicos, inclusive neoplásicos. (Gómez De ET al, 1997). Os dois tipos de MMPs com participação patogênica mais investigada nas neoplasias cutâneas são colagenases tipo IV, também reconhecidas como gelatinases (A ou metaloproteinase-2 da matriz, e B ou metaloproteinase-9 da matriz). (Seltzer JL e Eisen AZ , 2003. Carpena *et al*, 2007)

A expressão das gelatinases pode ser inibida pela expressão dos inibidores de metaloproteinases (TIMPs). O equilíbrio entre a expressão das MMPs e seus TIMPs determina a atividade proteolítica em processos fisiológicos e patológicos. O TIMP-1 têm a capacidade de diminuir a produção e a ativação da MMP-2 e o TIMP-2 têm a capacidade de diminuir a produção e a ativação da MMP-9 . (Bruckner-Tuderman L, 2003. Ribeiro *et al*, 2008).

Estudos prévios (Kerkela e Saarialho, 2003; Maciel *et al*, 2008;) avaliaram a expressão das MMPs nos CBCs, mas faltam dados conclusivos sobre a relação desta expressão com os tipos histológicos do tumor. (Ribeiro *et al*, 2008).

O objetivo do presente estudo foi avaliar a relação entre a expressão imunohistoquímica da MMP-2, MMP-9, e do TIMP-1 e TIMP-2 e os tipos histológicos de CBCs.

Material e Métodos

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Ciências da Saúde (UFCSPA) aprovou o desenvolvimento desta pesquisa (projeto número 378/08).

Através de um estudo transversal, foram avaliadas amostras teciduais de biópsias incisionais e excisionais de pele (com hipoderma), diagnosticadas como carcinoma basocelular, selecionadas consecutivamente em um laboratório de Patologia (LABSUL) da cidade de Porto Alegre (Brasil), durante o ano de 2007. As lâminas foram posteriormente revisadas e submetidas à técnica de imunohistoquímica no laboratório do Programa de Pós-Graduação em Patologia da UFCSPA.

Foram excluídos os casos que não possuíam laudo do exame histopatológico determinando o tipo histológico de carcinoma basocelular, os casos de carcinoma basocelular misto (dois tipos histopatológicos de carcinoma basocelular na mesma lesão tumoral), os casos que não

incluíram a hipoderme e os casos no quais ocorrera associação entre carcinoma basocelular e carcinoma epidermóide na mesma lesão tumoral.

As variáveis estudadas foram a expressão imunohistoquímica das MMP-2 e MMP-9 e de seus inibidores naturais TIMP-1 e TIMP-2 (variáveis dependentes), a idade, o sexo, a localização do tumor e o tipo histológico do carcinoma basocelular (variáveis independentes). Os cortes histológicos foram desparafinados, hidratados e então submetidos à recuperação antigênica com solução de tampão EDTA. Foi realizado bloqueio da atividade de peroxidase e de biotina. As amostras foram então incubadas com os anticorpos primários (clones Ab-4 anti-MMP-2, 1:800; Ab-3 anti MMP-9, 1:2000; Ab-2 anti TIMP-1, 1:600; e Ab-2 anti TIMP-2) por 18 horas, à temperatura ambiente. A amplificação da reação foi obtida com o sistema avidina-biotina-peroxidase. A revelação da reação foi feita utilizando-se 3,3'-tetrahidroclorato de diaminobenzidina.

A análise imunohistoquímica da expressão da MMP-2 e MMP-9, do TIMP-1 e TIMP-2, nas lâminas, foi realizada através de método qualitativo descrito na literatura. (Bonamigo *et al*, 2005), onde: (0) significa ausência de expressão (sem coloração marrom); (F) expressão fraca (coloração marrom fraca); (I) expressão intensa (coloração marrom forte). Foram avaliados o estroma e as células tumorais. As lâminas foram avaliadas por patologista experiente (AR) nos estudos de imunohistoquímica e metaloproteinases.

Quanto à análise estatística, os resultados gerais são apresentados através da distribuição de frequências simples e relativa. A avaliação das associações utilizou o qui-quadrado e na comparação do número de casos, observados de forma dependente (proporções), foi utilizado o teste de McNemar. Os dados foram avaliados através do software SPSS 13.0 (Statistical Package to Social Sciences for Windows). Para critérios de decisão, foi adotado o nível de significância (α) de 5% ($p < 0,05$).

Resultados

Caracterização geral da amostra

Foram estudados 72 amostras com carcinoma basocelular. Os pacientes apresentaram uma média de idade de 57,9 anos (DP=16,1 anos), e 51,5% (n=35) eram homens. A biópsia foi excisional em 61,1% (n=44) e incisional em 38,9% (n=28), com $\chi^2_{\text{calc}}=3,556$; $p=0,059$.

Agrupando os tipos de CBCs, a classificação final apresentou 69,4% (n=50) de sólidos, 20,8% (n=15) de superficiais e 9,7% (n=7) de esclerodermiformes e infiltrativos. A proporção de carcinomas classificados como sólidos se mostrou significativamente mais elevada nesta amostra ($\chi^2_{\text{calc}}=43,583$; $p < 0,001$).

Topograficamente houve predomínio significativo ($\chi^2_{\text{calc}}=44,839$; $p < 0,001$) da localização na face, com 43,5% (n=27) e no tórax, com 27,4% (n=17).

Tabela 1. Características gerais de amostra, com medidas de tendência central e de variabilidade

Variáveis	n=72 f (%) [*]
Idade (anos)	
Média ± desvio padrão	57,9 ± 16,1
Mínimo – máximo	28 – 90
Sexo NI=4 (5,6%) ^{**}	
Masculino	35 (51,5)
Feminino	33 (48,5)
Tipos de CBC	
Superficiais	15 (20,8)
Sólidos ^{***}	50 (69,4)
Esclerodermiformes e infiltrativos	7 (9,7)
Biópsia/Excisão	
Biópsia	28 (38,9)
Excisão	44 (61,1)
Local NI=10 (13,9) [*]	
Face ^{****}	27 (43,5)
Membros superiores	4 (6,5)
Membros inferiores	3 (4,8)
Tórax ^{****}	17 (27,4)
Região cervical	5 (8,1)
Não referido (pele)	6 (9,7)

*Valores apresentados com números absolutos e percentuais (%), com o percentual obtido sobre o total de casos válidos. **NI: número sem informações para a variável. *** $\chi^2_{\text{calc}}=43,583$; $p<0,001$. **** $\chi^2_{\text{calc}}=44,839$; $p<0,001$

A expressão imunohistoquímica das metaloproteinases -2 e -9 da matriz e dos inibidores teciduais -1 e -2 foi amplamente presente nos carcinomas basocelulares, independente do tipo histológico. A tabela 2 demonstra a expressão dos antígenos estudados e os tipos histológicos específicos de CBCs.

Tabela 2. MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2 e o tipo histológico de CBC: expressão imunohistoquímica

Variáveis	Tipo de CBC			P §
	Superficiais (n=13)	Sólidos (n=50)	Esclerodermiformes e infiltrativos (n=7)	
MMP-2 Tumor NI=2				
Fraco	7 (53,8)	32(64,0)	4 (57,1)	0,855
Forte	5 (38,5)	14(28,0)	2 (28,6)	
Negativo	1 (16,7)	4 (66,7)	1 (16,7)	
MMP-2 Estroma NI=2				
Fraco	8 (61,5)	34(68,0)	4 (57,1)	0,774
Forte	5 (38,5)	16(32,0)	3 (42,9)	
Negativo	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	
MMP-9 Tumor NI=1				
Fraco	9 (60,0)	22(44,9)	1 (14,3)	0,144
Forte	6 (40,0)	27(55,1)	6 (85,7)	
Negativo	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	

MMP-9 Estroma NI=2				
Fraco	8 (53,3)	17(35,4)	4 (57,1)	0,599
Forte	7 (46,7)	30(62,5)	3 (42,9)	
Negativo	0 (0,0)	1 (2,1)	0 (0,0)	
TIMP-1 Tumor NI=4				
Fraco	10 (71,4)	28(59,6)	4 (57,1)	0,191
Forte	3 (21,4)	4 (8,5)	0 (0,0)	
Negativo	1 (7,1)	15(31,9)	3 (42,9)	
TIMP-1 Estroma NI=4				
Fraco	8 (57,1)	21(44,7)	4 (57,1)	0,561
Forte	6 (42,9)	23(48,9)	2 (28,6)	
Negativo	0 (0,0)	3 (6,4)	1 (14,3)	
TIMP-2 Tumor				
Fraco	14 (93,3)	43(86,0)	5 (71,4)	0,176
Forte	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (14,3)	
Negativo	1 (6,7)	7 (14,0)	1 (14,3)	
TIMP-2 Estroma				
Fraco	12 (80,0)	38(76,0)	5 (71,4)	0,830
Forte	3 (20,0)	8 (16,0)	2 (28,6)	
Negativo	0 (0,0)	4 (8,0)	0 (0,0)	

**NI: número sem informações para a variável.*

Quanto aos CBCs em geral, nas células tumorais predominou a expressão fraca, com 61,2% (n=41), seguida da expressão forte, com 29,9% (n=20) e da ausência de expressão, com 9,0% (n=6). Em relação ao estroma, observou-se que 65,7% (n=44) dos casos foram classificados com expressão fraca, 34,3% (n=23) como forte e 0,0% (n=0) com ausência de expressão.

Não houve diferenças estatísticas na expressão imunohistoquímica da MMP-2 entre os subtipos de CBCs.

MMP-9 nos carcinomas basocelulares

Quanto aos CBCs em geral, nas células tumorais, 45,1% (n=32) tiveram expressão fraca, 54,9% (n=39) forte e nenhum caso teve ausência de expressão. Quanto às classificações para o estroma, 58,6% (n=41) possuíam expressão fraca, 10,0% (n=7) forte e 31,4% (n=22) dos casos não expressavam MMP-9.

Não houve diferenças estatísticas na expressão imunohistoquímica da MMP-9 entre os subtipos de CBCs.

Quanto aos CBCs em geral, nas células tumorais, a expressão da TIMP-1 foi fraca em 60,7% (n=34) dos casos, forte em 8,9% (n=5) e negativa em 30,4% (n=17) dos casos. No estroma, 50,0% (n=28) dos casos tiveram expressão fraca, 42,9% (n=24) forte e em 7,1% (n=4) não houve expressão. No estroma 76,4% (n=55) foram classificados como expressão fraca, 18,1% (n=13) como forte e 5,6% (n=4) com ausência de expressão.

Não houve diferenças estatísticas na expressão imunohistoquímica da TIMP-1 entre os subtipos de CBCs.

TIMP-2 nos carcinomas basocelulares

Quanto aos CBCs em geral, nas células tumorais, 86,1% (n=62) dos casos foram classificados como expressão fraca, 1,4% (n=1) como forte e 12,5% (n=9) com ausência de expressão, enquanto que, para o estroma, 76,4% (n=55) dos casos foram classificados como fracos, 18,1% (n=13) como forte e 5,6% (n=4) como negativos.

Não houve diferenças estatísticas na expressão imunohistoquímica da TIMP-2 entre os subtipos de CBCs.

As figuras 1 e 2 apresentam fotografias exemplificadoras da expressão imunohistoquímica das MMPs e dos TIMPs em carcinomas basocelulares.

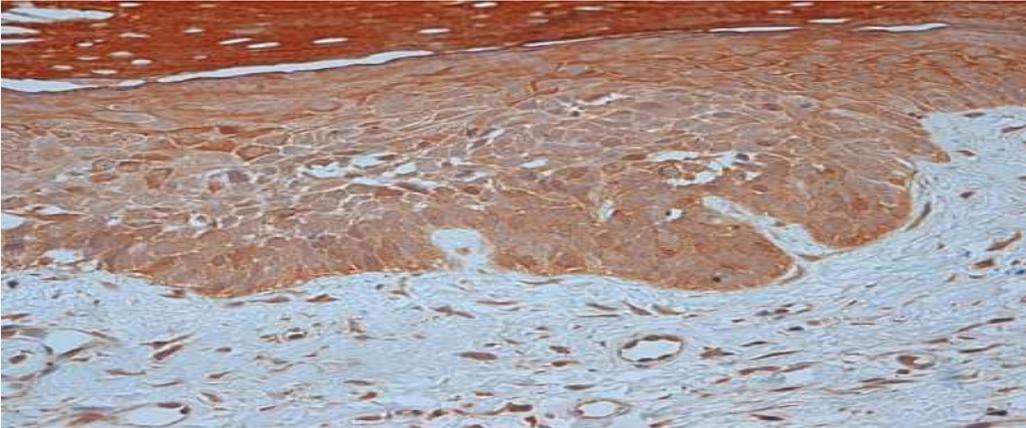


Figura 1: expressão forte da MMP-9 nas células tumorais e no estroma.

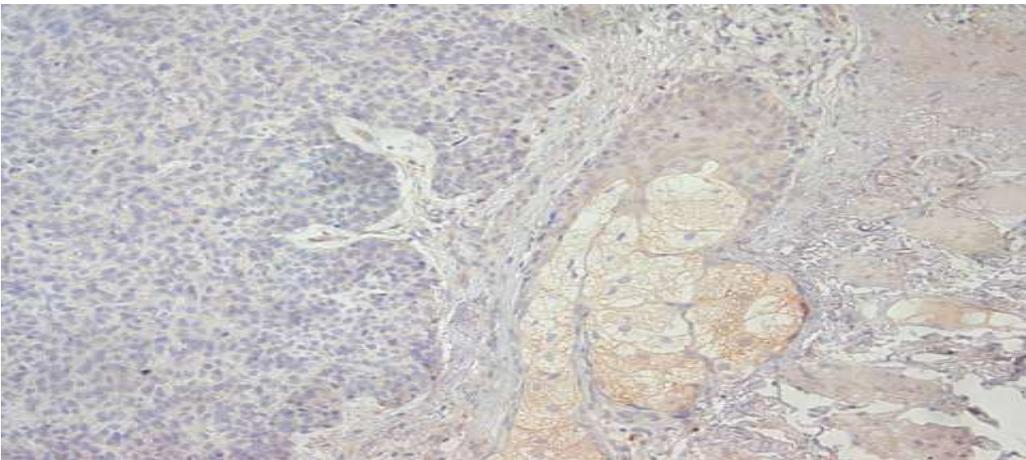


Figura 2: expressão fraca da TIMP-2 nas células tumorais e no estroma.

Discussão

Este estudo verificou a expressão imunoistoquímica das gelatinases e seus inibidores em biópsias de CBCs. A distribuição das variáveis independentes (idade, sexo, topografia) é semelhante às encontradas na literatura, assim como a predominância dos carcinomas

basocelulares sólidos ($p < 0,01$). (INCA. American Câncer Society. Chuang TY, 1990. Arranz, 2004). A grande maioria dos CBCs expressou nas células tumorais e no estroma, as gelatinases A e B e seus inibidores, porém as publicações sobre o tema não são homogêneas quanto aos detalhes dos dados encontrados. (Ribeiro *et al*, 2008).

No presente estudo foram encontradas algumas particularidades que podem auxiliar quanto à compreensão da distribuição destas gelatinases e seus inibidores nos diferentes tipos de carcinomas basocelulares.

Verificou-se que a MMP-2, a qual é geralmente definida como uma metaloproteinase da matriz que contribui muito para a invasividade tumoral, esteve expressa de forma semelhante no carcinoma considerado menos invasivo (superficial), no mais freqüente (nodular) e nos mais invasivos (esclerodermiformes/infiltrativos).

A expressão do TIMP-1 nas células tumorais mostrou-se superior (mas não de maneira estatisticamente significativa) nos CBCs superficiais (92,85% com expressão, sendo 71,4% com expressão fraca e 21,4% com expressão forte) quando comparados aos esclerodermiformes/infiltrativos (57,1%, todos com expressão fraca). Estes resultados poderiam sugerir menor inibição da ação da MMP-2 nestes carcinomas basocelulares.

Observou-se uma tendência da expressão da MMP-9 nas células tumorais ser fraca no CBC superficial (60%) e ser forte nos CBC

esclerodermiformes (85,7%). Porém, estas associações não se mostraram significativas ($p=0,144$).

Em relação ao TIMP-2, a análise de sua expressão nas células tumorais e no estroma demonstra um predomínio da expressão fraca em todos os tipos de CBCs, o que parece contrastar com o predomínio da expressão forte nas células tumorais da MMP-9 nos CBCs esclerodermiformes/infiltrativos, como demonstrado na tabela 2. Tal contexto poderia favorecer uma maior ação da MMP-9 na patogênese tumoral, em particular no tipo esclerodermiforme. O reduzido número de casos de CBCs esclerodermiformes e infiltrativos impediu uma análise estatística mais consistente para estes achados.

Apesar desta amostra superar numericamente a maioria das descritas em estudos anteriormente publicados sobre o tema, uma provável limitação foi a desproporção do número de CBCs sólidos comparados com os demais tipos, em particular os esclerodermiformes e os infiltrativos.

Conclusões

O estudo imunoistoquímico das gelatinases A e B e de seus inibidores naturais nos diferentes tipos histológicos de CBCs demonstra uma freqüente expressão dos marcadores estudados, não havendo demonstração de associações estatisticamente significativas com os 72 casos estudados.

O TIMP-1 mostrou tendência a ser menos expresso nos casos de CBCs esclerodermiformes/infiltrativos e talvez ocorra um desequilíbrio da expressão entre a MMP-2 e o TIMP-1 e entre a MMP-9 e o TIMP-2 nestes tipos de CBCs com maior poder de invasão.

Estudos ainda maiores, com ênfase em carcinomas basocelulares esclerodermiformes/infiltrativos devem ser encorajados para a confirmação desta hipótese, a qual possui implicações no prognóstico e no manejo terapêutico.

Referências Bibliográficas

American Cancer Society. Cancer facts and figures 2000. Available at: www.cancer.org. 2001. Accessed November 2008

Arranz FR, Rubio JFP, Salvado MMV, Sordo VV. Descriptive epidemiology of basal cell carcinoma and cutaneous squamous cell carcinoma in Soria (north-eastern Spain) 1998-2000: a hospital-based survey. *J EAVD* 2004;18:137-141.

Bonamigo RR, Bakos L, Edelweiss M, Cartell A. Could matrix metalloproteinase-9 be a link between *Demodex folliculorum* and rosacea? *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2005 Sep;19(5):646-7.

Bruckner-Tuderman L. Biology of extracellular Matrix. In: Bologna JL, Jorizzo JL, Rapini RP, editors. *Dermatology*. First Ed. London: Mosby; 2003. p. 1483-96

Carpina ABP, Francisco AAM, Bonamigo RR. As metaloproteinases-2 e -9 da matriz e o carcinoma espinocelular: uma análise da literatura. *Med Cutan Iber Lat Am* 2008;36(6):285-290

Chebassier N, El Houssein O, Viegas I, Dreno B. In vitro induction of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 expression in keratinocytes by boron and manganese. *Exp Dermatol* 2004;13(8): 484-90.

Chuang TY, Popescu A, Su WP, Chute CG. Basal cell carcinoma. A population based incidence study in Rochester, Minnesota. *J Am Dermatol* 1990; 22:413

Estimativa 2010, Incidência do Câncer no Brasil. Acesso em 14/03/10, em: http://www.inca.gov.br/estimativa/2010/index.asp?link=tbregioes_consolidado.asp&ID=1).

Fitzpatrick TB, Eisen AZ, Wolff K, Freedberg IM, Austen KF. In: *Dermatology in General Medicine*. McGraw-Hill, 1999, vol 2, pág. 2274-2292

Gómez De, Alonso DF, Yoshiji H, Thorgeirsson UP. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol* 1997;74:111-22.

Kahari VM, Saarialho-kere U. Matrix metalloproteinases in skin. *Exp Dermatol* 1997 Oct;6(5):199-213.

Kerkela E, Saarialho-Kere U. Matrix metalloproteinases in tumor progression: focus on basal and squamous cell skin cancer. *Exp Dermatol* 2003 Apr;12(2):109-25.

Pozo P, Valenzuela MA, Melej C, Zaldivar M, Puente J, Martinez B ET al. Longitudinal analysis of metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases and clinical parameters in gingival crevicular fluid from periodontitis-affected patients. *J Periodontal Res* 2005;40(3):199-207.

Ribeiro RIMA, Borges JR PC, Cardoso SV, Candelori I, Espíndola FS, Cassali GD, Loyola AM. Expressão de metaloproteínas de matriz e seus inibidores teciduais em carcinomas basocelulares. *J Bras Patol Med Lab* • v. 44 • n. 2 • p. 115-121 • abril 2008

Seltzer JL, Eisen AZ. The role of extracellular matrix metalloproteinases in connective tissue remodeling. In: Freedberg IM, Eisen AZ, Wolff K, Austen KF, Goldsmith LA, Katz SL, editors. *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine*. Sixth ed. New York: McGraw-Hill; 2003. P 200-9.

Varani J, Hattori Y, Chi Y, Schmidt T, Perone P, Zeigler ME, Fader DJ, Johnson TM. Collagenolytic and gelatinolytic matrix metalloproteinases and their inhibitors in basal cell carcinoma of skin: comparison with normal skin. *British Journal of Cancer* (2000) 82, 657–665. doi:10.1054/bjoc.1999.0978 www.bjcancer.com Published online 7 January 2000.

O câncer de pele é a neoplasia mais comum entre os seres humanos. Aproximadamente 80% destas neoplasias são carcinomas basocelulares.

O diagnóstico precoce da neoplasia, com um tratamento adequado, é geralmente curativo. Certos tipos de CBC, entretanto, são mais agressivos do que outros e podem receber tratamentos especiais.

Os objetivos deste estudo foram: “Avaliar a expressão imunohistoquímica das metaloproteinases da matriz (MMP-2 e MMP-9) e dos seus inibidores teciduais (TIMP-1 e TIMP-2) nos carcinomas basocelulares” e “Verificar se há relação preferencial entre a expressão imunohistoquímica da MMP-2, da MMP-9, da TIMP-1 e da TIMP-2 com determinados subtipos de carcinoma basocelular”.

A expressão imunohistoquímica das gelatinases e dos seus inibidores teciduais foi semelhante entre os subtipos de carcinomas basocelulares, mas ao contrário dos estudos anteriores, este mostrou tendências. Estas tendências podem ser melhor avaliadas em futuros estudos com maior número de casos de carcinomas basocelulares, em especial dos tipos histológicos esclerodermiformes e infiltrativos.

Novos estudos sobre marcadores prognósticos nos carcinomas basocelulares são importantes e devem ser conduzidos em busca do entendimento sobre os diferentes comportamentos entre mesmo tipo de

neoplasia, auxiliando assim na determinação de um tratamento mais adequado para cada caso.

6.1 Figuras da Introdução



Figura 1: carcinoma basocelular nodular

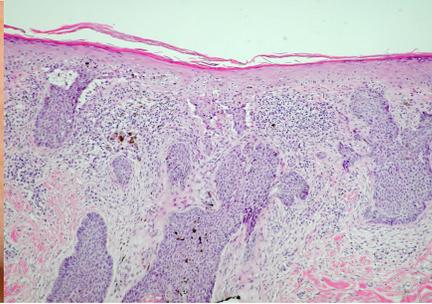


Figura 2: histopatologia do carcinoma basocelular nodular



Figura 3: carcinoma basocelular cístico

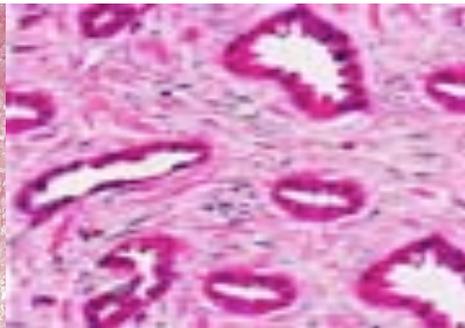


Figura 4: histopatologia do carcinoma basocelular cístico



Figura 5: carcinoma basocelular superficial

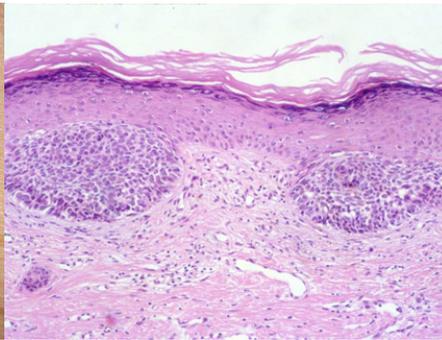


Figura 6: histopatologia do CBC superficial



Figura 7: carcinoma basocelular esclerodermiforme

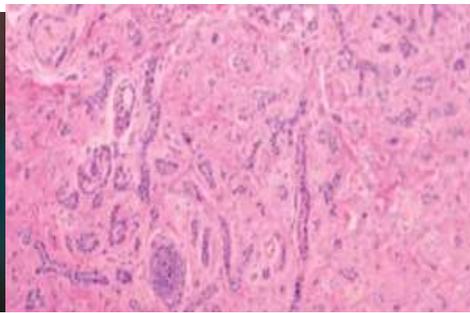


Figura 8: histopatologia do carcinoma basocelular esclerodermiforme

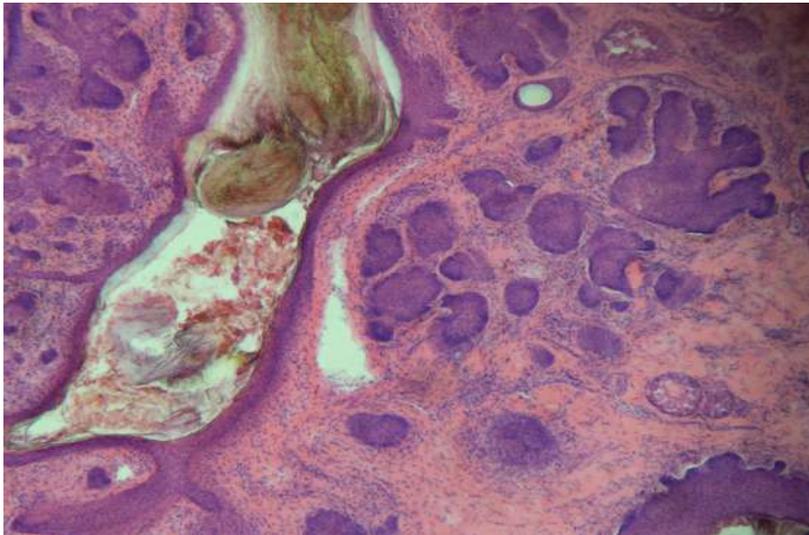


Figura 9: histopatologia do carcinoma basocelular micronodular



Figura 10: Fibroepitelioma de Pinkus

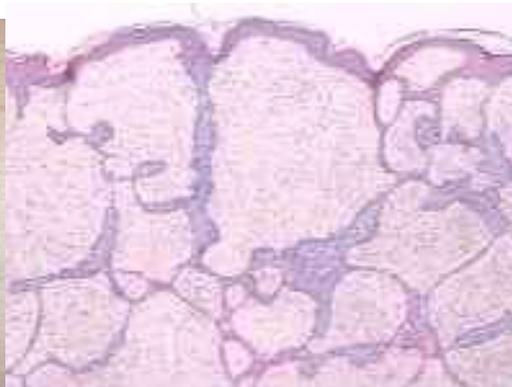


Figura 11: histopatologia do fibroepitelioma de Pinkus

Tabela 1. Características gerais de amostra, com medidas de tendência central e de variabilidade

Variáveis	n=72 f (%) [*]
Idade (anos)	
Média ± desvio padrão	57,9 ± 16,1
Mínimo – máximo	28 – 90
Sexo NI=4 (5,6%) ^{**}	
Masculino	35 (51,5)
Feminino	33 (48,5)
Tipos de CBC	
Superficiais	15 (20,8)
Sólidos ^{***}	50 (69,4)
Esclerodermiformes e infiltrativos	7 (9,7)
Biópsia/Excisão	
Biópsia	28 (38,9)
Excisão	44 (61,1)
Local NI=10 (13,9) [*]	
Face ^{****}	27 (43,5)
Membros superiores	4 (6,5)
Membros inferiores	3 (4,8)
Tórax ^{****}	17 (27,4)
Região cervical	5 (8,1)
Não referido (pele)	6 (9,7)

*Valores apresentados com números absolutos e percentuais (%), com o percentual obtido sobre o total de casos válidos. **NI: número sem informações para a variável. *** $\chi^2_{\text{calc}}=43,583$; $p<0,001$. **** $\chi^2_{\text{calc}}=44,839$; $p<0,001$

Table 1. General characteristics of the sample, with central tendency and variability measures.

Variables	n=72 f (%)**
Age (years)	
Mean \pm standard deviation	57.9 \pm 16.1
Minimum – maximum	28 – 90
Sex NI=4 (5.6%)*	
Male	35 (51.5)
Female	33 (48.5)
Types of BCC	
Superficial	15 (20.8)
Solid***	50 (69.4)
Sclerodermiform and infiltrative	7 (9.7)
Biopsy/Excision	
Biopsy	28 (38.9)
Excision	44 (61.1)
Site NI=10 (13.9)*	
Face****	27 (43.5)
Upper limbs	4 (6.5)
Lower limbs	3 (4.8)
Chest*****	17 (27.4)
Cervical region	5 (8.1)
Not mentioned (skin)	6 (9.7)

*NI: number without information for the variable. **Values presented with absolute and percentage (%) numbers, with the percentage obtained over the total number of valid cases. *** $\chi^2_{\text{calc}}=43.583$; $p<0.001$. **** $\chi^2_{\text{calc}}=44.839$; $p<0.001$

Tabela 2. MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2 e o tipo histológico de CBC:
expressão imunohistoquímica

Variáveis	Tipo de CBC			P §
	Superficiais (n=13)	Sólidos (n=50)	Esclerodermiformes e infiltrativos (n=7)	
MMP-2 Tumor NI=2				
Fraco	7 (53,8)	32(64,0)	4 (57,1)	0,855
Forte	5 (38,5)	14(28,0)	2 (28,6)	
Negativo	1 (16,7)	4 (66,7)	1 (16,7)	
MMP-2 Estroma NI=2				
Fraco	8 (61,5)	34(68,0)	4 (57,1)	0,774
Forte	5 (38,5)	16(32,0)	3 (42,9)	
Negativo	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	
MMP-9 Tumor NI=1				
Fraco	9 (60,0)	22(44,9)	1 (14,3)	0,144
Forte	6 (40,00)	27(55,1)	6 (85,7)	
Negativo	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	
MMP-9 Estroma NI=2				
Fraco	8 (53,3)	17(35,4)	4 (57,1)	0,599
Forte	7 (46,7)	30(62,5)	3 (42,9)	

Negativo	0 (0,0)	1 (2,1)	0 (0,0)	
TIMP-1 Tumor NI=4				
Fraco	10 (71,4)	28(59,6)	4 (57,1)	0,191
Forte	3 (21,4)	4 (8,5)	0 (0,0)	
Negativo	1 (7,1)	15(31,9)	3 (42,9)	
TIMP-1 Estroma				
NI=4				
Fraco	8 (57,1)	21(44,7)	4 (57,1)	0,561
Forte	6 (42,9)	23(48,9)	2 (28,6)	
Negativo	0 (0,0)	3 (6,4)	1 (14,3)	
TIMP-2 Tumor				
Fraco	14 (93,3)	43(86,0)	5 (71,4)	0,176
Forte	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (14,3)	
Negativo	1 (6,7)	7 (14,0)	1 (14,3)	
TIMP-2 Estroma				
Fraco	12 (80,0)	38(76,0)	5 (71,4)	0,830
Forte	3 (20,0)	8 (16,0)	2 (28,6)	
Negativo	0 (0,0)	4 (8,0)	0 (0,0)	

**NI: número sem informações para a variável.*

Table 2: MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2 and the histological type of BCC: immunohistochemical expression.

Variables	Type of BCC			P §
	Superficial (n=13)	Solid (n=50)	Sclerodermiform and infiltrative (n=7)	
MMP-2 Tumor NI=2				
Weak	7 (53,8)	32(64,0)	4 (57,1)	0,855
Strong	5 (38,5)	14(28,0)	2 (28,6)	
Negative	1 (16,7)	4 (66,7)	1 (16,7)	
MMP-2 Stroma NI=2				
Weak	8 (61,5)	34(68,0)	4 (57,1)	0,774
Strong	5 (38,5)	16(32,0)	3 (42,9)	
Negative	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	
MMP-9 Tumor NI=1				
Weak	9 (60,0)	22(44,9)	1 (14,3)	0,144
Strong	6 (40,00)	27(55,1)	6 (85,7)	
Negative	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	
MMP-9 Stroma NI=2				
Weak	8 (53,3)	17(35,4)	4 (57,1)	0,599
Strong	7 (46,7)	30(62,5)	3 (42,9)	
Negative	0 (0,0)	1 (2,1)	0 (0,0)	

TIMP-1 Tumor NI=4

Weak	10 (71,4)	28(59,6)	4 (57,1)	0,191
Strong	3 (21,4)	4 (8,5)	0 (0,0)	
Negative	1 (7,1)	15(31,9)	3 (42,9)	

TIMP-1 Stroma NI=4

Weak	8 (57,1)	21(44,7)	4 (57,1)	0,561
Strong	6 (42,9)	23(48,9)	2 (28,6)	
Negative	0 (0,0)	3 (6,4)	1 (14,3)	

TIMP-2 Tumor

Weak	14 (93,3)	43(86,0)	5 (71,4)	0,176
Strong	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (14,3)	
Negative	1 (6,7)	7 (14,0)	1 (14,3)	

TIMP-2 Stroma

Weak	12 (80,0)	38(76,0)	5 (71,4)	0,830
Strong	3 (20,0)	8 (16,0)	2 (28,6)	
Negative	0 (0,0)	4 (8,0)	0 (0,0)	

**NI: number without information for the variable*

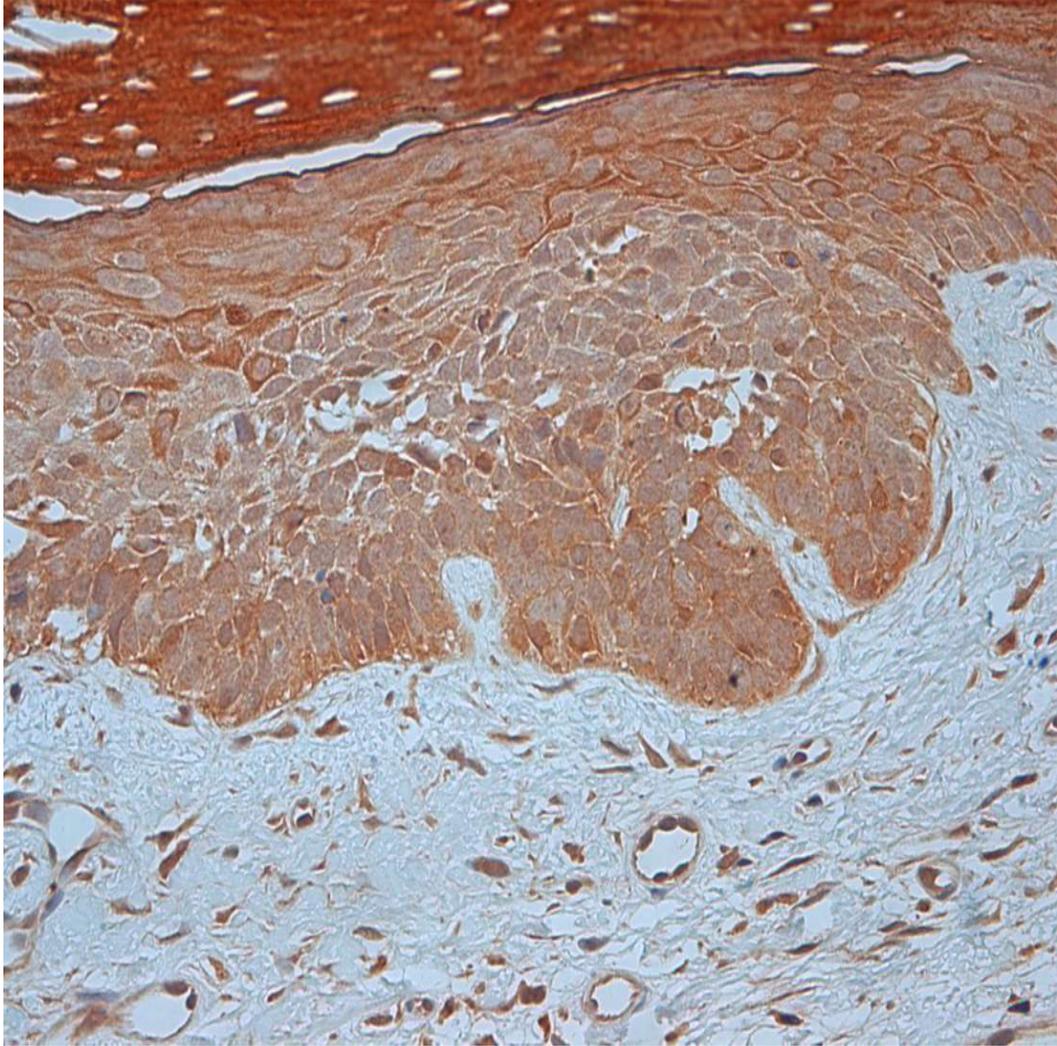


Figura 1: expressão forte da MMP9 nas células tumorais e no estroma;

Figure 1: MMP-9 strong expression in tumor cells and in stroma.

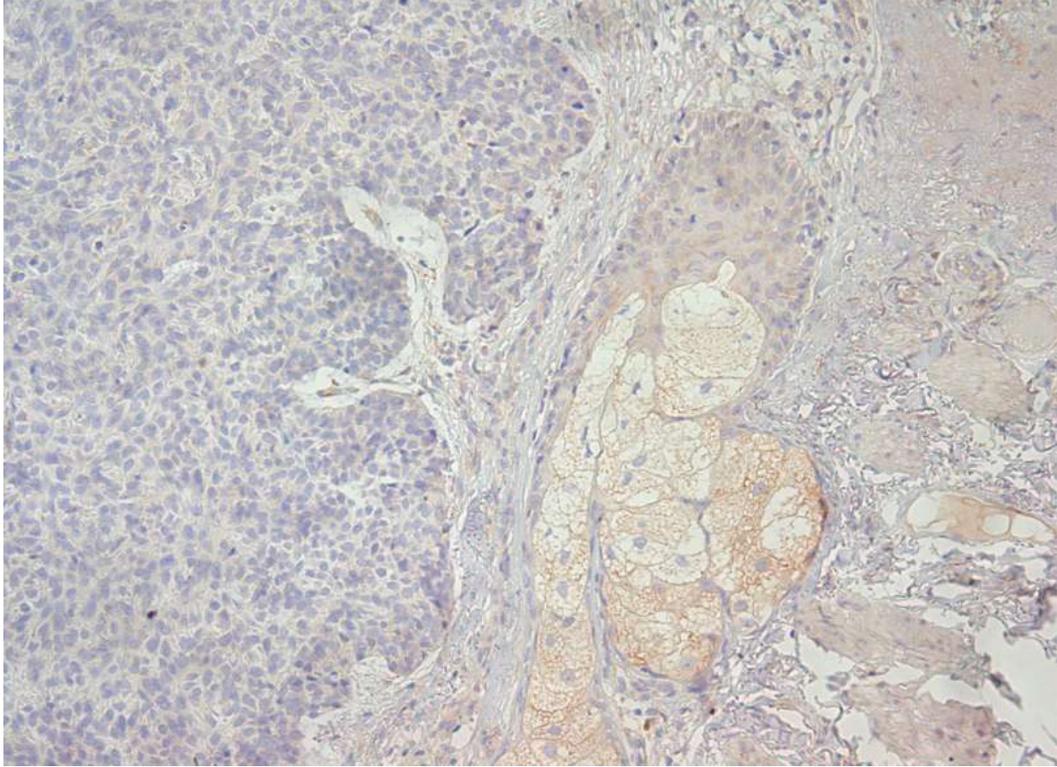


Figura 2: expressão fraca da TIMP-2 nas células tumorais e no estroma;

Figure 2: TIMP-2 weak expression in tumor cells and in stroma.

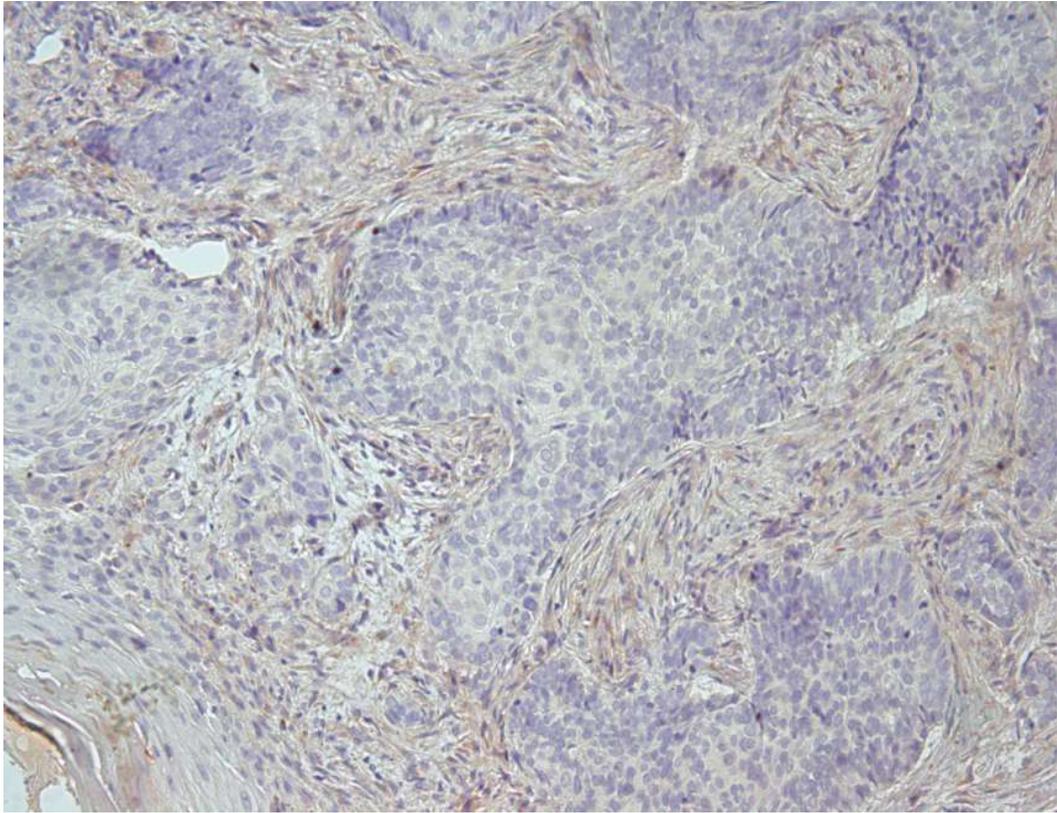


Figura 3: expressão fraca da MMP-2 nas células tumorais e forte no estroma

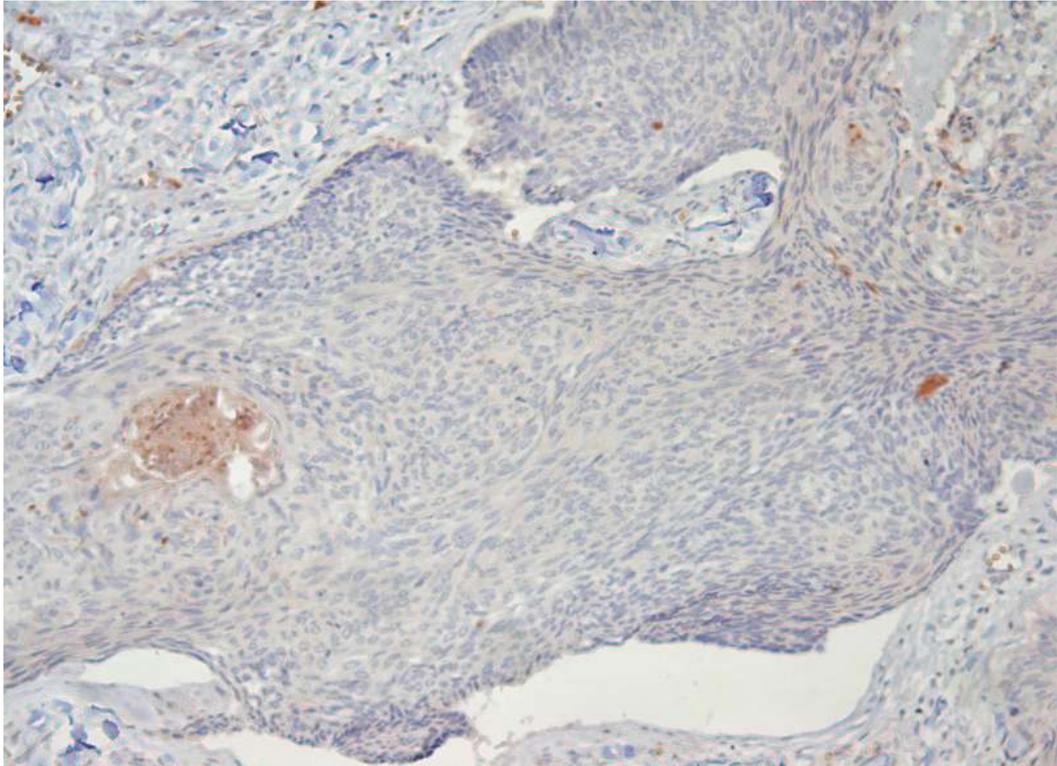


Figura 4: expressão fraca da TIMP-1 nas células tumorais e no estroma

Lavar com PBS cada corte e colocar em uma nova cubeta com PBS

Lavar com PBS 2 vezes por cinco minutos

Pingar anticorpo secundário (estrepto avidina – KIT), na câmara úmida e deixar por 40 minutos a 37° C (ou a temperatura ambiente)

Preparo do anticorpo secundário

Utilizar o KIT, fazer a diluição 1/100, ou seja, 1 µL do anticorpo para 100 µL de albumina bovina (BSA 1%)

Lavar com PBS cada corte e colocar em uma nova cubeta com PBS

Lavar com PBS 2 vezes por 5 minutos

Colocar na câmara úmida

Pingar a estrepto avidina

Preparo da estrepto avidina

Utilizar o kit, fazer a diluição 1/100, ou seja, 1 µL do anticorpo A mais 1 µL do anticorpo B para 100 µL de albumina bovina (BSA 1%). Fazer e deixar o complexo avidina-biotina reagir por 30 minutos antes de pingar nas lâminas.

Deixar por 40 minutos em estufa a 37° C ou em temperatura ambiente

Lavar com PBS uma a uma (2 vezes por 5 minutos)

Reação com cromógeno (DAB 60 mg/100 ml de PBS – homogenizar e colocar 2 ml de H₂O₂ para cuba ou 0,015 mg de DAB + 25 ml de PBS + 0,5 ml de H₂O₂)

Mergulhar as lâminas no DAB por 5 minutos ou deixar corar na lâmina

Retirar uma a uma e colocar na H₂O destilada

Fazer a contra-coloração (bateria da capela com hematoxilina + amônia 2%)

Montar a lâmina com lamínula

Identificar

6.7 Parecer do Comitê de `Etica em Pesquisa da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

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](#)