

**A EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DAS METALOPROTEINASES DA MATRIZ  
-2 E -9 NO MELANOMA CUTÂNEO PRIMÁRIO**

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul**  
**Faculdade de Medicina**  
**Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas**

**A EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DAS METALOPROTEINASES DA MATRIZ  
-2 E -9 NO MELANOMA CUTÂNEO PRIMÁRIO**

**Eduardo Schenini Diehl**

**Orientadora: Prof. Dra. Maria Isabel Albano Edelweiss**

**Co-orientador: Prof. Dr. Lúcio Bakos**

**Dissertação de Mestrado**

**2007**

## 1. DEDICATÓRIAS

Dedico este trabalho a **todos os profissionais** que, de alguma forma, dedicam-se ao estudo e cuidados de pacientes com melanoma.

Este trabalho é dedicado, acima de tudo, **a todos os pacientes e seus familiares** envolvidos com o melanoma: doença que ainda traz tanto sofrimento.

## 2. AGRADECIMENTOS

Ao **Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas**, pelo aprendizado e pela oportunidade a mim oferecida.

À minha Orientadora, **Profa. Dra. Maria Isabel Albano Edelweiss**, pela amizade, estímulo constante, positividade contagiante e apoio incondicional.

Ao meu Co-Orientador e chefe do Serviço de Dermatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, **Prof. Dr. Lúcio Bakos**, que me acolheu de braços abertos.

Ao **Prof. André Cartell** pelo auxílio na leitura das lâminas e por ter compartilhado comigo um pouco de seu vasto conhecimento em dermatopatologia do melanoma.

Aos funcionários do **Serviço de Dermatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre**, onde fui recebido com muito carinho, e, em especial, a **Sra. Bernadete Hahmeyer**.

Aos funcionários do **Serviço de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre** pelo apoio e amigável convivência.

À técnica **Neiva Copetti** pelo auxílio na confecção das lâminas de imunohistoquímica.

Aos colegas **Jorge Fauri** e **Nathália Costaguta Matas Solés Masiero**, sempre prestativos na árdua tarefa de seleção de casos e revisão de prontuários.

Aos funcionários do **Serviço de Arquivo Médico e de Informações em Saúde (SAMIS)** –  
**Hospital de Clínicas de Porto Alegre**, pelo imprescindível auxílio.

Aos funcionários do **Serviço de Citopatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre** e,  
sobretudo, ao **Prof. Dr. João Carlos Prolla** pela ajuda na digitalização das imagens.

Ao **Hospital São Lucas da PUCRS**, onde recebi a minha formação em Médico Internista.

Ao **Instituto Lauro de Souza Lima – SP** onde adquiri alta capacitação como Dermatologista e  
despertei minha curiosidade científica.

Ao **Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de  
Porto Alegre (FIPE)** pelo auxílio financeiro na compra de materiais.

Ao meu amor, **Dani**, pelo apoio e carinho em todos os momentos.

Aos **meus pais**, pelo exemplo de vida.

### 3. SUMÁRIO

<b>1. Dedicatórias</b> .....	<b>3</b>
<b>2. Agradecimentos</b> .....	<b>4</b>
<b>3. Sumário</b> .....	<b>6</b>
<b>4. Lista de abreviaturas e siglas</b> .....	<b>8</b>
<b>5. Lista de tabelas</b> .....	<b>10</b>
<b>6. Lista de figuras</b> .....	<b>11</b>
<b>7. Lista de anexos</b> .....	<b>12</b>
<b>8. Revisão da Literatura: Base Teórica</b> .....	<b>13</b>
<b>8.1. Introdução</b> .....	<b>14</b>
<b>8.2. Melanoma cutâneo: aspectos gerais</b> .....	<b>15</b>
<b>8.3. Fundamentos em dermatopatologia do melanoma cutâneo</b> .....	<b>20</b>
<b>8.4. Metaloproteinases da matriz: características gerais</b> .....	<b>26</b>
<b>8.5. Características específicas das metaloproteinases</b> .....	<b>32</b>
<b>8.6. Metaloproteinase da matriz tipo 2 (MMP-2)</b> .....	<b>34</b>
<b>8.7. Metaloproteinase da matriz tipo 9 (MMP-9)</b> .....	<b>35</b>
<b>8.8. Metaloproteinases da matriz tipo 2 e 9 em neoplasias</b> .....	<b>36</b>
<b>8.9. Metaloproteinases da matriz -2 -9 no melanoma cutâneo</b> .....	<b>37</b>
<b>8.10. Tratamentos anti-metaloproteinases</b> .....	<b>44</b>
<b>9. Objetivos</b> .....	<b>48</b>
<b>10. Referências Bibliográficas da Revisão da Literatura</b> .....	<b>49</b>
<b>11. Artigo em português</b> .....	<b>69</b>
<b>11.1. Resumo</b> .....	<b>70</b>
<b>11.2. Introdução</b> .....	<b>72</b>
<b>11.3. Materiais e Métodos</b> .....	<b>73</b>

<b>11.4. Resultados</b> .....	<b>75</b>
<b>11.5. Discussão</b> .....	<b>83</b>
<b>11.6. Referências</b> .....	<b>86</b>
<b>12. Artigo em inglês</b> .....	<b>89</b>
<b>12.1 Abstract</b> .....	<b>90</b>
<b>12.2 Introduction</b> .....	<b>92</b>
<b>12.3. Material and Methods</b> .....	<b>93</b>
<b>12.4. Results</b> .....	<b>95</b>
<b>12.5. Discussion</b> .....	<b>102</b>
<b>12.6. References</b> .....	<b>106</b>
<b>13. Considerações Finais e Perspectivas</b> .....	<b>109</b>
<b>14. Demais anexos</b> .....	<b>111</b>

#### 4. LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ca<sup>++</sup> - íon de cálcio

Cat – domínio Catalítico

CSF-1 - Fator Estimulador de Colônias-1 (*Colony-Stimulating Factor-*)

CSF-macrófagos – Fator Estimulador de Colônias de Macrófagos (*macrophages Colony-Stimulating Factor*)

DAB - diaminobenzidina

EC – Comissão de Enzimas (*Enzyme Commission*)

EDTA –ácido etilenodiamino tetra-acético (*ethylenediamine tetracetic acid*).

EGF – Fator de Crescimento Epidérmico (*Epidermal growth factor*)

ELISA – enzimaimunoensaio (*enzyme-linked immunosorbent assay*)

EMMPRIN – indutor de metaloproteinases da matriz (*extracellular matrix metalloproteinase inducer*)

ET – endotelina

ET-1 – endotelina -1

ET-3 – endotelina -3

ET<sub>b</sub>R – receptor de endotelina-B (*endothelin-B receptor*)

Fn – domínio fibronectina

GPI – glicosilfosfatidilinositol (*glycosylphosphatidylinositol*)

HPX – domínio hemopexina

IC – Intervalo de Confiança

IFN- $\gamma$  – interferon gama

IL-1 $\beta$  – interleucina-1 $\beta$  (*interleukin -1 $\beta$* )

IL-2 – interleucina-2 (*interleukin-2*)

IL-2R $\alpha$  – receptor de interleucina-2 $\alpha$  (*interleukin-2 $\alpha$  receptor*)

Ig – domínio IgG-símile

INCA – Instituto Nacional do Câncer do Brasil

kDa – quilodáton (*kilodalton*)

LDH – desidrogenase láctea (*Lactate dehydrogenase*)

MAC – macrófago

MAST - mastócito

MEC – matriz extra-celular

MMP - metaloproteinase da matriz (*matrix metalloproteinase*)

MO – medula óssea

MT-MMP – metaloproteinase tipo-membrana (*membrane-type matrix metalloproteinase*)

NEUT – neutrófilos

OR - Razão de Chances (*Odds ratio*)

RECK – proteína rica em cisteína indutora de reversão (*Reversion cysteine-rich protein*)

PM – peso molecular

Pro – pró-peptídeo

S – sinal peptídeo

SDS – Dodecil Sulfato de Sódio (*Sodium Dodecil Sulfate*)

TIMP – inibidor tecidual das metaloprpteinases (*Tissue inhibitor of metalloproteinases*)

UniProt – Recurso Universal de Proteínas (*Universal Protein Resource*)

Zn – sítio ativo de zinco

Zn<sup>++</sup> - íon de zinco

## 5. LISTA DE TABELAS

### Lista de tabelas da revisão da literatura:

<b>Tabela I:</b> Principais marcadores imunoistoquímicos para melanoma convencional.....	22
<b>Tabela II:</b> Características histopatológicas do melanoma convencional.....	25
<b>Tabela III:</b> Metaloproteinases: Aspectos históricos.....	26
<b>Tabela IV:</b> Características específicas das MMPs humanas.....	32, 33

### Lista de tabelas do artigo em português

<b>Tabela I:</b> Frequência dos subtipos histológicos encontrados e sua relação com o sexo em 55 casos de melanoma .....	76
<b>Tabela II:</b> Frequência da espessura tumoral em 55 casos de melanoma.....	76
<b>Tabela III:</b> Frequência de nível de invasão Clark em 55 casos de melanoma.....	77
<b>Tabela IV:</b> Correlação entre a expressão imunoistoquímica das MMPs- 2 e -9 na neoplasia, endotélio e região peritumoral, bem como a média dessas regiões com a espessura de Breslow e o nível de Clark.....	79

### Lista de tabelas do artigo em inglês

<b>Tabela I:</b> Frequency of histological subtypes and their relation with sex in 55 cases of melanoma.....	96
<b>Tabela II:</b> Frequency of tumor thickness in 55 cases of melanoma .....	96
<b>Tabela III:</b> Frequency of Clark invasion level in 55 cases of melanoma.....	97
<b>Tabela IV:</b> Correlation between the immunohistochemical expression of MMPs -2 e -9 inside neoplastic, endothelial and peritumoral stromal cells, as well as the average of these sites with Breslow thickness and Clark level .....	99

## 6. LISTA DE FIGURAS

### Lista de Figuras da Revisão da Bibliografia

<b>Figura I:</b> Estruturas esquemáticas dos domínios comuns das MMPs -2 e -9.....	31
<b>Figura II:</b> Principais interações entre MMP-2 e melanoma.....	40
<b>Figura III:</b> Migração de células neoplásicas pelos vasos.....	42
<b>Figura IV:</b> Principais interações entre MMP-9 e melanoma.....	43

### Lista de Figuras do Artigo em Português

<b>Figura I:</b> Expressão imunoistoquímica da MMP -2 .....	78
<b>Figura II:</b> Expressão imunoistoquímica da MMP-9.....	78
<b>Figura III:</b> A expressão imunoistoquímica da MMP-9 em 54 casos de melanoma conforme o nível de Clark .....	81
<b>Figura IV:</b> A expressão imunoistoquímica da MMP-9 em 55 casos de melanoma conforme espessura de Breslow.....	81
<b>Figura V:</b> A expressão imunoistoquímica da MMP-2 em 54 casos de melanoma conforme nível de Clark.....	82
<b>Figura VI:</b> A expressão imunoistoquímica da MMP-2 em 55 casos de melanoma conforme espessura de Breslow .....	82

### Lista de Figuras do Artigo em Inglês

<b>Figura I:</b> Immunoistochemical expression of MMP-2. ....	97
<b>Figura II:</b> Immunoistochemical expression of MMP-9.....	98
<b>Figura III:</b> Average immunohistochemical expression of MMP-9 in 54 cases of melanoma according to Clark level.....	100
<b>Figura IV:</b> Average immunohistochemical expression of MMP-9 in 54 cases of melanoma according to Clark level .....	100
<b>Figura V:</b> Average immunohistochemical expression of MMP-2 in 54 cases of melanoma according to Clark level.....	101
<b>Figura VI:</b> Average immunohistochemical expression of MMP-2 in 55 cases of melanoma according to Breslow thickness.....	102

## 7. LISTA DE ANEXOS

<b>Anexo I:</b> Estadiamento Patológico do Melanoma Cutâneo (pTNM).....	46
<b>Anexo II:</b> Melanoma Cutâneo: Grupamento por estádios TNM.....	47
<b>Anexo III:</b> Instrumento de coleta de dados – imunoistoquímica – MMPs -2 e -9.....	111
<b>Anexo IV:</b> Instrumento de coleta de dados – H-E e características clínicas.....	112
<b>Anexo V:</b> Técnica laboratorial de imunoistoquímica utilizada.....	113

# **1. Revisão da Literatura**

## **Base Teórica**

## 8.1. Introdução

O melanoma cutâneo, devido a sua alta mortalidade e incidência crescente em vários países incluindo o Brasil, é considerado um relevante problema de saúde pública em nosso meio (1-4). Apesar dos avanços consideráveis no entendimento de sua fisiopatologia, muitas questões referentes ao seu comportamento biológico ainda permanecem em aberto (5).

As metaloproteinases da matriz (MMPs), são enzimas cujo espectro de funções biológicas tem sido estudado e parece aumentar a cada dia (6, 7). O grupo das gelatinases (MMP-2 e MMP-9) são as que, aparentemente, degradam componentes da membrana basal com maior facilidade. Tal característica seria importante para auxiliar a migração de células de melanoma da epiderme para o derme subjacente e, conseqüentemente, para a invasão tumoral (8).

O papel das MMPs na progressão do melanoma cutâneo tem sido muito estudado, sobretudo, em modelos animais e em cultura de células (8, 9). Entretanto, estudos de lesões cutâneas primárias em humanos por técnica de imunistoquímica têm revelado resultados contraditórios quanto à expressão da enzima em diversos estágios evolutivos e subtipos histológicos do melanoma (8). De modo geral, são trabalhos com uma amostragem pequena de lesões. Há estudo que indica que a MMP-2 poderia desempenhar fator prognóstico independente das outras variáveis histopatológicas classicamente utilizadas para esse fim, sendo que nesse trabalho não havia relação entre sua expressão e demais variáveis histopatológicas (10).

Um resultado aquém do esperado nos ensaios clínicos com inibidores de metaloproteinases em doentes com melanoma cutâneo reforça a necessidade de mais estudos sobre interações entre as MMPs e o microambiente peritumoral nas diversas fases evolutivas da neoplasia (11, 12).

O trabalho desenvolvido tem o objetivo de auxiliar no preenchimento dessa lacuna, através do estudo por técnica de imunistoquímica da expressão das MMPs -2 e -9 em lesões de

melanoma cutâneo primário, bem como correlacioná-la com as variáveis histológicas utilizadas em rotina de patologia cirúrgica.

## **8.2. Melanoma cutâneo: aspectos gerais**

O melanoma cutâneo, neoplasia dos melanócitos, é uma doença grave caracterizada por uma alta capacidade de invasão e de gerar metástases (1, 3-5). Embora represente apenas 4% do total de neoplasias na pele, é a principal causa de morte por câncer cutâneo (5).

Sua incidência vem aumentando na população branca de todo o mundo nas últimas décadas, e apesar dos avanços em quimioterapia e em imunoterapia, o prognóstico da doença avançada ainda é reservado (3, 4).

No Brasil, onde a incidência também parece estar em ascensão (2, 13), um estudo baseado em relatórios anátomo-patológicos revelou que o melanoma corresponde a 0,15% de todas as neoplasias malignas (14). Dados do Instituto Nacional de Câncer do Brasil (INCA) indicam quase 6.000 novos casos no Brasil no ano de 2006, sendo as maiores taxas na Região Sul (2).

Extensos esforços têm sido dirigidos na tentativa de identificar fatores de risco para o desenvolvimento do melanoma (3).

Em nosso meio, um estudo de caso-controle demonstrou, através de cuidadosa análise de regressão logística, a grande importância das queimaduras solares intermitentes como fator de risco para o desenvolvimento de melanoma cutâneo (OR=11,4, com IC 95% entre 2,6 e 50,5). Por outro lado, a utilização de fotoprotetores, sobretudo os com fator de proteção acima de 15 mostrou-se como um fator protetor (15).

Outros fatores de risco para o desenvolvimento de melanoma incluem: história familiar de melanoma, presença de múltiplos nevos melanocíticos tanto típicos quanto atípicos (nevo “displásico” ou de Clark), nevos gigantes (acima de 20 cm de diâmetro), imunossupressão, pele

fototipo 1 de Fitzpatrick, presença de olhos azuis, cabelos ruivos e sardas (3, 4). Considera-se como sendo fatores de risco, embora sem evidências tão fortes: exposição a câmaras de bronzeamento artificial, obesidade, ocupação industrial, história pessoal de tumores de pele não-melanoma, nível sócio-econômico elevado, cabelos castanhos, sexo masculino bem como estrógenos e progesterona endógenos (3). Tem sido sugerido ainda a utilização domiciliar de pesticidas como fator de risco (16). Hormônios exógenos, álcool, cigarro, café, vitaminas A e E e gestação não parecem ser relevantes fatores de risco para o melanoma (3). Apesar de ainda haver controvérsias quanto à associação de doença de Parkinson e o desenvolvimento de melanoma, parece improvável a relação causal entre a utilização da levodopa e o surgimento da neoplasia (17, 18).

Doenças genéticas raras como o xeroderma pigmentoso também predis põem ao melanoma (19). Existem ainda doenças hereditárias incomuns como a síndrome de Li-Fraumeni e síndrome Lynch tipo II que predis põem ao surgimento de neoplasias, entre elas o melanoma (3).

Embora possa ocorrer em todas as localizações onde haja melanócitos, ou seja, nos olhos, ouvidos, intestinos, leptomeninges, mucosa genital e oral, o melanoma primário ocorre na pele em mais de 95% das vezes (3, 5).

A seqüência de eventos que leva um melanócito normal a se transformar em células de melanoma ainda não está completamente elucidada. Provavelmente envolva vários estágios de mutações gênicas progressivas que alteram a proliferação, diferenciação e morte celular. Soma-se a isso o efeito carcinogênico da radiação ultravioleta nos melanomas não acrais (1, 5).

A grande maioria dos melanomas inicia como proliferações intra-epidérmicas, as quais podem ou não estar relacionadas com nevos melanocíticos (20). Acredita-se que em aproximadamente 70% das vezes, o melanoma surja *de novo* (21).

A duração dessa fase intra-epitelial pode variar de meses até vários anos, período em que essas lesões proliferativas vão apresentando graus crescentes de desordem arquitetural e atipias citológicas (20).

O melanoma cutâneo apresenta subtipos histológicos geralmente bem definidos que se refletem em diferentes comportamentos clínicos, biológicos e epidemiológicos. São eles: lentigo maligno melanoma, melanoma de espalhamento superficial, melanoma nodular e melanoma lentiginoso acral (1, 4, 5, 20). Tipos histológicos raros, de difícil caracterização e muitas vezes controversos descritos na literatura incluem: melanoma desmoplásico (22), melanoma neurotrópico (23), melanoma Spitzóide (24), nevo azul maligno (25), melanoma verrucoso (26), melanoma pleomórfico (sarcomatóide) (20), melanoma de pequenas células (27), melanoma de células balonizantes (28), melanoma em células de sinete (29), melanoma rabdóide (30), melanoma mixoide (31), melanoma dérmico (32), melanoma osteogênico (33), tumor basomelanocítico (34) e sarcoma de células claras (melanoma de tecidos moles) (35) (20).

O melanoma de espalhamento superficial é o mais freqüente na população branca. Ocorre principalmente no tronco de homens e nas pernas de mulheres. A idade média de início encontra-se entre 30 e 50 anos. A manifestação clínica mais habitual é a de uma mancha/placa plana ou levemente elevada, com várias tonalidades de cores na mesma lesão. A lesão usualmente é assimétrica e as bordas são irregulares (1).

O melanoma nodular usualmente é o mais espesso. A localização mais comum é extremidade inferior e tronco. A lesão costuma ter crescimento mais rápido que os outros subtipos. Caracteriza-se por pápula ou nódulo com tonalidade marrom-escura ou negra, o qual pode ulcerar e sangrar aos pequenos traumas. Quando amelanótico, o diagnóstico clínico diferencial com granuloma piogênico é necessário (1).

O lentigo maligno melanoma costuma ser dividido em lentigo maligno e lentigo maligno melanoma propriamente dito. O lentigo maligno, conhecido inicialmente por sarda de Hutchinson (36) ou melanose de Dubreuilh (37) é o lentigo maligno melanoma *in situ*. Quando

há invasão para a derme, este passa a ser chamado de lentigo maligno melanoma. A incidência desse subtipo parece estar em ascensão nos Estados Unidos. Tipicamente, ocorre em locais de exposição solar crônica onde a melanose solar é comum como: cabeça, pescoço e braços. Seu crescimento é lento e usualmente acomete indivíduos idosos (3). Estima-se que cerca de 5 a 8% dos lentigos malignos darão origem a lentigos malignos melanomas, mas esses números são controversos. Há relatos de lentigos malignos amelanóticos que exigem alto nível de suspeição diagnóstica (38).

O melanoma lentiginoso acral é mais freqüente em negros e asiáticos. Ocorre na região palmo - plantar e no aparelho ungueal. Manifesta-se habitualmente como uma lesão de várias tonalidades de cores ou enegrecida, bordas irregulares e freqüentemente ulcerada. O melanoma do aparelho ungueal caracteriza-se, geralmente, pelo surgimento de uma estria longitudinal acastanhada (melanoníquia) na lâmina ungueal. Pode ocorrer mudança da coloração de toda a unha e ulceração. O local mais acometido é o hálux. O sinal de Hutchinson (área cutânea acastanhada ou negra na região da cutícula ou periungueal) é tido como patognomônico. O sol não parece desempenhar papel importante na etiopatogenia desse subtipo de melanoma (1). O prognóstico é ruim pelo fato de habitualmente o paciente demorar a buscar auxílio médico (39).

Em levantamento realizado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre o subtipo histológico predominante foi o melanoma de espalhamento superficial (61,2%), seguidos do melanoma nodular (24%), lentigo maligno melanoma (12,6%) e melanoma lentiginoso acral (2,9%) (15).

Em estudo feito em outro hospital terciário de Porto Alegre os resultados foram semelhantes (40).

Historicamente, o fator prognóstico mais importante no melanoma cutâneo primário é a espessura tumoral (41) e, em menor grau, o nível de invasão (42). Mais recentemente, tem-se sugerido que um modelo multifatorial é necessário para entendermos o comportamento biológico de progressão da neoplasia (9).

A espessura tumoral (medida com o auxílio de uma régua micrométrica), ou Breslow, é a distância em milímetros entre a célula neoplásica situada mais profundamente na pele e as células mais superficiais da camada granulosa (41).

Já o nível de invasão, ou Clark, refere-se à localização do tumor em relação às diversas camadas histológicas da pele (42).

São descritos ainda como fator prognóstico desfavorável encontrados na lesão primária do melanoma: presença de ulceração, alto índice mitótico, ausência de infiltrado invadindo o tumor, presença de áreas de regressão espontânea, satelitose, angiotropismo, invasão vascular e linfática (20).

A classificação TNM atual do melanoma (43), baseada fundamentalmente na versão final do Comitê Americano sobre Sistema de Estadiamento em Melanoma Cutâneo publicado no final do ano 2001 (44), foi revisada em 2005 (45). Leva em conta a espessura da lesão (Breslow), nível de invasão (Clark), presença de ulceração acima de 3mm de diâmetro, número e tipo de metástases linfonodais, presença de satelitose, presença de metástases em trânsito e sistêmicas. O anexo I descreve, integralmente, o estadiamento patológico TNM do melanoma (45), enquanto o anexo II representa seu grupamento por estágio (43).

Enquanto que pacientes em estágio I apresentam sobrevida em 5 anos acima de 90%, pacientes com metástases sistêmicas apresentam prognóstico sombrio, com uma sobrevida média de pouco mais de 6 meses (1,46).

O tratamento do melanoma varia conforme o estágio clínico da doença, mas é fundamentalmente cirúrgico. Há controvérsias quanto ao papel da linfadenectomia e os resultados com quimioterapia sistêmica são desapontadores (1).

Estão em estudo agentes modificadores da resposta biológica como: interleucina-2, interferon-gama, fator estimulador de colônias de macrófagos, vacinas e inibidores das metaloproteinases (1, 11, 12, 47-49).

As interações entre as células tumorais e o estroma desempenham papel fundamental na progressão da neoplasia e têm sido objeto atual de estudos (50).

### **8.3. Fundamentos em dermatopatologia do melanoma cutâneo**

Embora em algumas situações o melanoma cutâneo se apresente como algumas variedades patológicas raras e de difícil caracterização citadas anteriormente (20, 22-35), atentaremos para os subtipos histológicos mais encontrados na prática da dermatopatologia. São eles: melanoma de espalhamento superficial, lentigo maligno e lentigo maligno melanoma, melanoma nodular e melanoma lentiginoso acral (1, 3, 4, 20, 51). Em conjunto, são conhecidos como melanoma convencional (20).

Apesar de haver trabalhos indicando que para cada um desses subtipos histológicos haveria um prognóstico diferente (52), uma análise multivariada cuidadosa põe em dúvida tal afirmação (53). Tanto é verdade que para o estadiamento TNM do melanoma não se leva em conta tais subdivisões histológicas (43, 44).

O melanoma de espalhamento superficial habitualmente ocorre em áreas de exposição solar intermitente não havendo, portanto, elastose solar exuberante (20). Elastose solar é um acúmulo de material na derme com características de coloração semelhantes à elastina. Tal material é composto por constituintes normais de fibras elásticas (elastina, fibrilinas, versican e glicosaminoglicanos), porém dispostos aleatoriamente em agrupamentos de forma completamente diferente das fibras elásticas normais (54).

Este subtipo histológico de melanoma caracteriza-se por uma proliferação de melanócitos atípicos que podem estar reunidos em ninhos. Disseminação pagetóide (migração dos melanócitos para os estratos superiores da epiderme semelhante ao que ocorre com as células da doença de Paget mamária) é freqüente. A epiderme, muitas vezes está hiperplásica. Áreas de regressão espontânea parcial são freqüentes no melanoma de espalhamento superficial e,

sobretudo, no lentigo maligno melanoma (20, 51). Tal fenômeno pode subestimar a espessura da lesão, conforme já alertavam Gromet *et al.* há quase 30 anos (55). Mais recentemente, Massi *et al.* descreveram que, em melanomas finos ( $< 1,5\text{mm}$ ), o parâmetro quantitativo T + R (espessura do tumor mais espessura da regressão) é importante fator independente preditivo de progressão da neoplasia (56).

Microscopicamente, a fase inicial de regressão é caracterizada por um denso infiltrado inflamatório linfocítico semelhante ao que ocorre no nevo halo. Mais tarde, ocorre fibrose dérmica contendo um número variável de melanófagos (20, 51).

O lentigo maligno é a lesão precursora do lentigo maligno melanoma e se caracteriza por uma proliferação individual ou em ninhos de melanócitos atípicos ao longo da membrana basal da epiderme. As células atípicas são pequenas, por vezes fusiformes, com nucléolo proeminente e caracteristicamente apresentam halo pericelular por artefato de fixação. Os melanócitos podem crescer ao longo das porções superiores do folículo piloso e se estender ao nível do ducto da glândula sebácea. É comum atrofia cutânea e elastose solar (20, 51).

Ao romper a membrana basal da epiderme, a lesão passa a chamar-se lentigo maligno melanoma. Muitas vezes, sobretudo quando há infiltrado inflamatório próximo à membrana basal bem como incontinência pigmentar acentuada, é difícil saber, por coloração habitual de patologia, (hematoxilina-eosina) se houve quebra da barreira epiderme-derme (20, 51). Nesses casos, o uso de marcadores de imunistoquímica como a proteína S-100 e o HMB-45 podem ser de grande valor (57). A tabela I compara os marcadores imunistoquímicos mais utilizados em melanoma quanto sua sensibilidade e especificidade, bem como o tipo de material que eles podem ser utilizados.

**Tabela I: Principais marcadores imunoistoquímicos para melanoma convencional:**

	<b>Material</b>	<b>Sensibilidade</b>	<b>Especificidade</b>
proteína S-100	Parafina, congelação	Alta	Baixa
gp100 ( HMB-45)	Parafina, congelação	Alta	Alta
Melan-A ( Mart-1)	Parafina, congelação	Alta	Alta
Fator de transcrição da microftalmia (MITF)	Parafina, congelação	Alta	Alta
Tirosinase	Parafina, congelação	Alta	Alta
Receptor p75 de neurotropina	Parafina, congelação	Variável	Baixa
NKI/C3	Parafina	Alta	Baixa
Vimentina	Parafina, congelação	Alta	Nenhuma
Enolase neurônio específica	Parafina, congelação	Moderada	Baixa

Adaptado de Barnhill (20).

Além da imunoistoquímica, outros métodos podem ser empregados para auxiliar no diagnóstico e estadiamento patológico do melanoma. A coloração por Giemsa mostrou-se útil para distinguir células de melanoma das células do infiltrado inflamatório e derrame pigmentar abaixo da lesão em um estudo (58). Nessa coloração há uma diferenciação entre pigmento melânico e de hemossiderina nos cortes corados com hematoxilina-eosina e entre o pigmento melânico e a cor amarronzada decorrente da utilização de diaminobenzidina (DAB) na imunoistoquímica (58).

Desmoplasia (formação de tecido fibroso reativo) e neurotropismo (afinidade por invadir tecido neural) são mais frequentes no lentigo maligno melanoma do que no melanoma de espalhamento superficial (20).

O melanoma nodular caracteriza-se por apresentar massa de células neoplásicas com núcleos uniformemente atípicos, membranas nucleares irregulares, hiperchromatismo nuclear e nucléolos evidentes. O índice mitótico costuma ser elevado. Por convenção, o componente pagetóide do tumor na epiderme deve se restringir a três cones interpapilares de distância (20, 51).

Ainda não existe uma uniformidade quanto a melhor maneira de descrever o índice mitótico (59). Embora alguns patologistas relatem-no de forma semi-quantitativa (leve, moderado ou intenso), há a tendência em tentar ser o mais objetivo possível, descrevendo o número aproximado de mitoses por  $\text{mm}^2$  ou 10 campos de grande aumento (lente objetiva com aumento de 40X) (20, 46, 59). O índice mitótico representou fator prognóstico independente em vários estudos, incluindo um que envolveu grande número de pacientes (60).

O melanoma lentiginoso acral inicia-se como uma proliferação lentiginosa melanocítica na região basal da epiderme. Há acantose (aumento da espessura da camada espinhosa devido à proliferação celular) proeminente, espessamento do estrato córneo e freqüentemente proliferação de melanócitos para dentro dos ductos écrinos. Em lesões mais avançadas, disseminação pagetóide é comum, bem como a formação de ninhos de melanócitos na epiderme. Denso infiltrado inflamatório mononuclear e áreas de regressão são usuais (20, 51).

Os melanomas lentiginosos acrais e os nodulares são os que mais apresentam ulceração (20,51). Balch *et al.* demonstraram que a ulceração é um fator desfavorável no prognóstico dos melanomas, independentemente da sua espessura, e que a sobrevida diminui com o aumento da extensão da área ulcerada (61). A profundidade da úlcera não tem valor prognóstico. O mecanismo da ulceração não está bem elucidado; possivelmente está relacionado com a diminuição do suprimento sangüíneo pela rápida expansão tumoral na derme. Outros mecanismos possíveis para explicar ulceração seriam a fragilidade e a conseqüente ruptura da epiderme devido à sua infiltração pelas células neoplásicas (disseminação pagetóide) (20).

Independentemente do subtipo histológico, a espessura de Breslow, ou seja, a profundidade da lesão medida em milímetros do topo da camada granulosa da epiderme até a célula neoplásica mais profunda no derma subjacente, é o fator prognóstico mais importante da lesão primária do melanoma cutâneo (41). Em caso de ulceração, a medida deve ser feita a partir da base da úlcera e, em caso de haver envolvimento de anexos, este não deve ser incluído em sua medida (20, 46).

A invasão local do melanoma pode ser dividida em 5 estágios ou graus de invasão: os níveis de Clark. São eles: nível I - neoplasia confinada à epiderme; nível II – invasão à derme papilar; nível III – preenchimento de toda a derme papilar; nível IV - penetração da derme reticular e nível V – invasão do tecido celular gorduroso subcutâneo (42). O nível de Clark não é tão objetivo e é menos reprodutível entre diferentes observadores do que a espessura de Breslow. É difícil saber exatamente onde termina a derme papilar e inicia a reticular. Assim, a distinção entre o Clark III e IV é, algumas vezes, problemática (20). O nível de Clark parece ser de maior importância nos melanomas finos (< 1mm) onde pode ser considerado fator prognóstico independente da espessura da lesão (44). Em tais casos, o nível de Clark é considerado para o estadiamento TNM (43).

Outra variável anatomopatológica muito descrita na literatura, mas ainda polêmica em virtude da falta de critérios objetivos sobretudo nos melanomas finos, é a fase de crescimento (59, 62). O melanoma teria uma fase inicial de crescimento horizontal ou radial. Nesta fase haveria crescimento centrífugo horizontal e microinvasões verticais para dentro da derme papilar. Mais tarde, o tumor adquiriria propriedades macroinvasoras e metastáticas: fase de crescimento vertical. Acredita-se que em 10% dos casos, não há crescimento horizontal precedendo o vertical (20).

A tabela II resume, de forma comparativa, algumas características histopatológicas nos subtipos de melanoma mais encontrados.

**Tabela II: Características histopatológicas do melanoma convencional**

	<b>Espalhamento Superficial</b>	<b>Nodular</b>	<b>Lentigo Maligno /Lentigo Maligno Melanoma</b>	<b>Lentiginoso Acral</b>
<b>Padrão de crescimento intra-epidérmico</b>	Paquetóide, em ninhos	-	Lentiginoso, em ninhos, pagetóide	Lentiginoso, em ninhos, pagetóide
<b>Epideme</b>	Hiperplásica	-	Atrófica	Hiperplasia acentuada
<b>Derme papilar</b>	Inflamada/Espessada	-	Variavelmente inflamada	Inflamada, espessada
<b>Regressão</b>	Comum	Rara	Comum	Comum
<b>Elastose solar no derma</b>	Discreta	Discreta, Variável	Acentuada	Nenhuma
<b>Desmoplasia</b>	Incomum	Incomum	Comum	Comum
<b>Neurotropismo</b>	Incomum	Incomum	Comum	Comum
<b>Nevo precursor (%)</b>	20-33	8	3	-

Adaptado de Barnhill (20).

#### 8.4. Metaloproteinases da Matriz: características gerais

Metaloproteinases (MMPs) -ou metaloproteases da matriz - constituem uma família de enzimas (proteínas que catalisam ou aceleram reações químicas) do grupo das proteases (7).

A nomenclatura das enzimas começou a ser padronizada a partir de 1955, quando o Congresso Internacional de Bioquímica em Bruxelas criou uma Comissão de Enzimas (63). A primeira versão completa foi publicada em 1961 e a edição atual (sexta), publicada pela União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular em 1992, continha 3196 enzimas diferentes. Desde então, esse número tem crescido de forma constante (64).

A tabela III ilustra alguns aspectos históricos em relação às metaloproteinases.

Ano	Fato	Referências
1955	Início da padronização da nomenclatura das enzimas- Congresso Internacional de Bioquímica em Bruxelas	(63)
1962	Primeira descrição de MMP	(65)
1968	Purificada MMP na pele humana	(66)
1972	Primeira possível descrição da MMP-2	(67)
1974	Primeira possível descrição da MMP-9	(68)
1992	Apresentado os princípios da nomeação das MMPs e seu agrupamento dentro da subfamília das metaloproteinases	(69)

Número de EC (do inglês, *Enzyme Commission* ou número de “Comissão de Enzimas”) é uma classificação numérica de enzimas baseada nas reações químicas que elas catalisam. Dessa forma, rigorosamente falando, os números EC não se referem especificamente a enzimas, mas sim, às reações catalisadas por elas. Se diferentes enzimas (por exemplo, de diferentes microorganismos) catalisam a mesma reação, elas recebem o mesmo número EC (64). Cada subgrupo de enzima é representado pelas letras EC, seguida de três números separados por pontos. Para cada enzima em particular, acrescenta-se ainda outro ponto e número (64). As

MMPs classificam-se como EC 3.4.24, indicando que são metaloendopeptidases (representadas pelo número 24), contidas dentro do grupo das proteases (indicado pelo número 4) que, por sua vez, faz parte de um grupo ainda maior: o grupo das hidrolases (representado pelo número 3) (70).

Hidrolases são enzimas que catalizam a hidrólise de uma ligação peptídica. Se tal hidrólise ocorrer entre os aminoácidos das proteínas, trata-se de uma protease (71).

As proteases podem quebrar ligações peptídicas na terminação amino ou carboxil da proteína ou na parte interna da mesma. No primeiro caso denomina-se exopeptidase e, no segundo, endopeptidase. Embora alguns autores utilizem o termo protease e proteinase como sinônimos, há tendência em reservar a denominação proteinase exclusivamente para endopeptidases (71).

As proteases podem ser divididas em seis famílias se formos caracterizá-las de acordo com a natureza do grupo funcional mais proeminente em seus sítios ativos. São elas: proteases de serina, proteases de cisteína, proteases de ácido aspártico, proteases de treonina, proteases de ácido glutâmico e metaloproteinases (64).

As proteínas, incluindo as enzimas, são classificadas também em nível molecular. O UniProt (do inglês, Universal Protein Resource), disponível gratuitamente em meio eletrônico no endereço <http://www.ebi.uniprot.org/index.shtml>, é um grande banco de dados financiado principalmente pelo Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos da América. Atualizado duas vezes por semana, o UniProt identifica as proteínas de acordo com sua seqüência específica de aminoácidos (72, 73).

As metaloproteinases da matriz (MMPs), também conhecidas por matrixinas, pertencem a um grupo poligênico de endopeptidases zinco-dependentes que tem como função mais estudada a degradação da matriz extra celular (MEC) tanto em processos patológicos quanto fisiológicos (7, 74, 75).

As MMPs são divididas de acordo com a especificidade do substrato em 5 grupos: colagenases, gelatinases, estromelinas, matrilisinas e MMPs tipo membrana (MT-MMPs) (6). Seis MMPs humanas não se encaixam em nenhum dos grupos acima: MMP-12 (metaloelastase); MMP-19 (RASI-1); MMP-20 (enamelisina); MMP-23 (CA-MMP); MMP-27 (C-MMP) e a MMP-28 (epilisina) (6).

As MT-MMPs são ligadas covalentemente à membrana celular, enquanto as MMPs secretadas (colagenases, gelatinases, estromelinas e matrilisinas), localizam-se na superfície celular através da ligação com integrinas ou interação com proteoglicanas e colágeno tipo IV (6, 74).

Embora há muito tempo já se reconheça que o colágeno do tecido conjuntivo é rapidamente quebrado em muitas situações fisiológicas como remodelamento ósseo, involução uterina pós-parto e embriogênese bem como processos patológicos como úlcera de decúbito, câncer e artrite, não havia evidências identificando os fatores envolvidos (7). Então, em 1962, Gross e Lapière (65) demonstraram que a pele da cauda em reabsorção de girino em metamorfose, quando cultivada em géis de colágeno, liberava uma enzima capaz de atacar a tripla hélice de colágeno. Essa enzima era uma verdadeira colagenase que poderia digerir o colágeno em um pH neutro e temperatura de 27°C (bem abaixo da temperatura de desnaturação do colágeno) (65). Analisando retrospectivamente, tal atividade era possivelmente devido à MMP-18 (7).

Nos anos seguintes, várias outras MMPs foram encontradas, iniciando com a gelatinase A (MMP-2) (67) e estromelina (MMP-3) (76) e se continuando até a identificação de pelo menos 23 MMPs em seres humanos (6, 47).

As MMPs apresentam várias características em comum. Todas contêm zinco na região ativada unida à seqüência conservada HEXXHXXGXXHXXXXXXXXM (histidina, ácido glutâmico, variáveis, histidina, variáveis, glicina, variáveis, histidina, variáveis e metionina) (47). Todas requerem uma ligação octaédrica de íons cálcio para manter integridade estrutural.

A porção pró-peptídica contém uma seqüência PRCVPD (prolina, arginina, cisteína, valina, prolina, ácido aspártico) conservada imediatamente acima da terminação aminoácida da enzima ativa, importante na ativação do zimogênio. Todas as MMPs são inativadas pela família dos inibidores tissulares das proteínas (TIMPs) (7, 47).

As MMPs ligam um íon de metal como  $Zn^{++}$  ou  $Ca^{++}$  em seus sítios de ativação. O íon usualmente serve para coordenar dois a quatro lados das cadeias e é indispensável para atividade da enzima. O íon, por si só, é coordenado por uma molécula de água, a qual é também crucial para a atividade catalítica (6,7,74).

O funcionamento adequado das MMPs envolvem a ligação de  $Ca^{++}$  assim como  $Zn^{++}$ . Apenas o  $Zn^{++}$  é ligado no sítio ativo da enzima. O  $Ca^{++}$  é necessário apenas para manter a conformação da molécula (74).

As MMPs apresentam grande semelhança estrutural entre si e muitas apresentam similares especificidades ao substrato. A complexidade estrutural varia desde a MMP mais simples (MMP-7 ou matrilisina) que possui apenas um sinal peptídico, um pró-peptídeo e um domínio catalítico (77), até a mais complexa (MMP-9) (75).

#### **Ativação e inibição das MMPs**

O processo de ativação e inibição das MMPs é extremamente complexo e dinâmico, sendo modulado através da expressão gênica, ativação de pró-enzimas latentes e interação com inibidores (47).

A transcrição dos genes das MMPs é reativa a uma grande variedade de oncogenes, fatores de crescimento, citocinas e hormônios (6).

As MMPs são sintetizadas como proteínas inativas ( pró-enzimas latentes), incapazes de realizar proteólise, que podem ser ativadas por proteinases como tripsina, plasmina, furina ou mesmo outras MMPs como a estromelisina e as MMPs tipo membrana. Também podem ser ativadas *in vitro*, por agentes químicos como: mercuriais, glutatona oxidada, dodecil sulfato de

sódio (SDS), agentes caotrópicos, oxigênio reativo, além de baixo pH e aquecimento (6). Tais agentes, muito provavelmente, atuam removendo o domínio pró-peptídeo e expondo o  $Zn^{2+}$  (78).

Há uma série de inibidores das MMPs que rapidamente bloqueiam suas ações, entre eles estão os membros da família das  $\alpha_2$ -macroglobulinas, as trombospondinas, os inibidores teciduais das metaloproteinases (TIMPs), a proteína RECK e outros (6, 7).

As  $\alpha_2$ -macroglobulinas são inibidores inespecíficos de endopeptidases que capturam as MMPs ativas e clivam uma região específica dessa enzima inativando-as (6).

As trombospondinas ligam-se à MMP-2 e -9 promovendo o seu *clearence* via endocitose e bloqueando suas atividades proteolíticas (6).

A família dos TIMPs é constituída por quatro membros, TIMP-1, -2, -3 e -4, que inibem as MMPs de forma seletiva, reversível, não covalente e com estequiometria molecular na razão 1:1 (7). Recentemente, tem sido descrito que o papel dos TIMPs é mais amplo do que simplesmente inibir MMPs. Eles apresentam (principalmente o TIMP-1) atividades anti-apoptótica em várias linhagens celulares, de forma dependente ou mesmo independente das MMPs. Atividades pró-apoptóticas dependentes ou independentes de MMPs foram descritas principalmente quanto ao TIMP-3. Estudos relativos ao papel dos TIMPs quanto à proliferação celular e regulação de angiogênese têm sido tema atual de debate e controvérsias (79).

O antigo conceito de que os TIMPs apresentam sempre atividades anti-neoplásicas nem sempre é considerado verdadeiro, já que o TIMP-2, em baixas concentrações, promove a ativação da pró-MMP-2 (8).

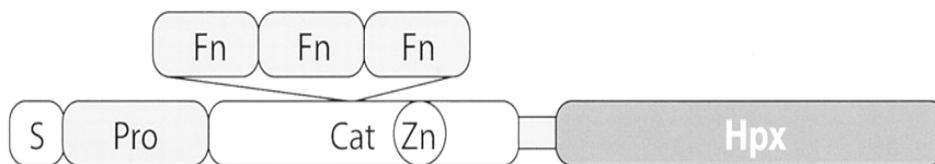
Outro inibidor de MMP descrito é a RECK (proteína rica em cisteína indutora de reversão). Trata-se de uma glicoproteína que inibe a liberação da pró-MMP-9 e inibe diretamente a MMP-2 e -9 e MT1-MMP. Além disso, ela inibe processos catalíticos que levam à ativação da pró-MMP-2 (80).

Sinteticamente, MMPs podem ser inibidas por agentes quelantes como o EDTA, bem como drogas recentes anti-neoplásicas que serão discutidas posteriormente. Medicamentos antigos

como doxiciclina, tetraciclina quimicamente modificadas, bifosfonados e vastatinas possivelmente apresentam alguma atividade anti-MMP (6,48).

### **Estrutura das MMPs -2 e -9**

Como as MMPs-2 e-9 apresentam estrutura muito semelhantes, serão discutidas em conjunto. Tanto a MMP-2 quanto a MMP-9 apresentam as seguintes estruturas: sinal peptídeo, domínio pró-peptídeo, domínio fibronectina tipo II, domínio catalítico e região hemopexina-símile. A MMP-9 possui ainda um domínio colágeno-símile (6, 7, 47, 75, 76). A figura I representa as estruturas que estão presentes nas duas enzimas.



**Figura I: Estruturas esquemáticas dos domínios comuns das MMPs -2 e -9.**

**Abreviaturas:** S: sinal peptídeo; Pro: pró-peptídeo; Cat: domínio catalítico; Zn: sítio ativo de zinco; Hpx: domínio hemopexina e Fn: domínio fibronectina tipo II .

**Fonte:** Visse R *et al.* (6)

### **Sinal peptídeo**

Todas as MMPs são sintetizadas dentro da célula. Então, seus RNAm especificam uma sequência de sinal hidrofóbica (sinal peptídeo), tipicamente contendo 18 a 30 aminoácidos. Essa região é cortada durante a passagem da pró-enzima ao meio extra-celular (6,7,47).

### **Pró-peptídeo**

O domínio pró-peptídeo estende-se do N-terminal criado após a remoção do peptídeo sinal até o começo do domínio catalítico em um comprimento típico de 80 aminoácidos (6,7,47). O resíduo de cisteína da sequência conservada PRCGVPD está posicionado de forma

diretamente oposta ao átomo de  $Zn^{2++}$  ao centro ativo. A remoção desse resíduo de cisteína ativa a pró-enzima (*the cysteine switch*) (78).

### **Domínio fibronectina II**

O domínio fibronectina II apresenta cerca de 58 resíduos em 3 repetições. É responsável pela especificidade da ação colagenolítica (6,7,47).

### **Domínio catalítico**

Este domínio apresenta cerca de 170 aminoácidos com o centro ativo catalítico nos 50-54 resíduos C-terminais (6,7,47).

### **Região de ligação**

Também conhecida por região de dobradiça, ou região flexível. Liga a região hemopexina-símile com o domínio catalítico (6,7,47).

### **Região hemopexina-símile**

Com cerca de 210 resíduos, determina substratos e inibidores de cada MMP (6,7,47).

### **Domínio colágeno-símile**

Presente apenas na MMP-9 (não representado na figura I), possui 55 aminoácidos. É rico em prolina, homólogo à cadeia  $\alpha 2$  do colágeno tipo V. Seu papel ainda não é claro (6,7,47).

## **8.5. Características específicas das metaloproteinases**

A tabela IV, adaptada (6, 47, 74), resume as principais características específicas de cada MMP. Em muitos casos, MMPs diferentes apresentam características e funções semelhantes (7).

**Tabela IV: Características específicas das MMPs humanas:**

<b>MMP</b>	<b>Nomes comuns/ alternativos</b>	<b>localização o cromossômica</b>	<b>PM kDa latente/ativado</b>	<b>Alguns substratos</b>
1	Colagenase 1	11q22-q23	52/41	Colágeno I, II, III, VII, VIII, X, entactina, agreguina, colágeno desnaturado, IL-1 $\beta$ , proteína básica mielínica, L-selectina, pró-MMP-1, pró-MMP-2, pró-MMP-9

2	Gelatinase A Colagenase tipo 4 de 72kDa	16q13	72/67	Colágeno desnaturado, colágeno IV, V, VII, X, XI, XIV, colágeno I, elastina, fibronectina, laminina, agreguina, vitronectina, entactina, osteonectina, IL-1 $\beta$ , plasminogênio, proteína básica mielínica
3	Estromelisina 1 Proteoglicanase Transina 1	11q23	57/45	Proteína de core proteoglicana, laminina, fibronectina, colágeno I, III, IV, V, IX, X, XI, XVIII, colágeno desnaturado, elastina, tenascina, agreguina, proteína básica mielínica, entactina, decorita, osteonectina
7	Matrilisina 1 PUMP 1	11q21- q22	28/19	Colágeno I, IV, V, IX, X, XI, XVIII, colágeno desnaturado, laminina, fibronectina, elastina, agreguina, tenascina, proteína básica mielínica
8	Colagenase Neutrofilica Colagenase 2	11q21- q22	85/64	Colágeno I, II, III, V, VII, VIII, X, colágeno desnaturado, agreguina, fibronectina, entactina
9	Gelatinase B Colagenase tipo IV de 92 kDa	20q11.2- q13.1	92 / 67	Colágeno desnaturado, colágenos I, IV, V, VII, X, XI XIV, XVIII, elastina, laminina, entactina, agreguina, fibronectina, vitronectina, osteonectina, IL-1 $\beta$ , plasminogênio, proteína básica mielínica, pró-MMP-2, pró-MMP-9
10	Estromelisina-2 Transina-2	11q22.3- q23	56 / 47	Proteína de core proteoglicana, colágeno I, III, IV, IV, V, laminina, fibronectina, elastina, agreguina, pró-MMP-1, -8 e -10
11	Estromelisina-3	22q11.2	58 / 28	fibronectina, laminina, agreguina, colágeno desnaturado, protease alfa- <sub>1</sub>
12	Metaloelastase Elastase de macrófagos	11q22.2- q22.3	54/45	Elastina, colágeno I, IV, vitronectina, plasminogênio, laminina, entactina, fibrinogênio, fibrilina, fibronectina, colágeno desnaturado, inibidor da proteinase-1, apolipoproteína A, proteína básica de mielina.
13	Colagenase 3	11q22.3	65 / 55	Colágeno I, II, III, IV, IX, X, XIV, XVIII, colágeno desnaturado, fibronectina, laminina, osteonectina, serpina, agreguina, entactina, tenascina
14	MT1-MMP Metaloproteinase 1 de membrana	14q11- q12	66 / 60	Colágeno I, II, III, colágeno desnaturado, fibronectina, laminina, vitronectina, entactina, proteoglicanos, agreguina, pró-MMPs -2 e -13
15	MT2-MMP Metaloproteinase 2 de membrana	15q13- q21	68 / 62	Fibronectina, laminina, agreguina, tenascina, perlecan, proteoglicanos, pró-MMP-2
16	MT3-MMP Metaloproteinase 3 de membrana	8q21	64 / 55	Colágeno III, colágeno desnaturado, fibronectina, caseína, proteoglicanas de cartilagem, laminina 1, macroglobulina 2, pró-MMP-2
17	MT4-MMP Metaloproteinase 4 de membrana	12q24.3	71 / 67	Gelatina, fibrinogênio, fibrina, precursor de TNF, pró-MMP-2
18	Colagenase 4	?	?	Colágeno I, II, III, gelatina
19	Estromelisina-4 RASI-1	12q14	57	Colágeno I, IV, gelatina, agreguina, fibrinogênio, laminina, tenascina, proteína oligométrica da matriz cartilaginosa
20	Enemilisina	11q22.3	54 / 43	Amelogenina, agreguina, proteína oligométrica da matriz cartilaginosa
23	CA-MMP	1q36.3	44	Gelatina
24	MT5-MMP Metaloproteinase 5 de membrana	20q11.2	73 / 64	Fibronectina, gelatina, pró-MMP-2
25	MT6-MMP Metaloproteinase 6 de membrana	16q13.3	62/58	Colágeno-IV, gelatina, fibronectina, fibrila, pró-MMP-2, -9
26	Matrilisina 2 Endometase	11q15	29 / 19	Gelatina, Inibidor da protease alfa, pró-MMP-9.
27	C-MMP	11q24	?	?
28	Epilisina	17q21.1	56/ 45	Caseína

**Legenda:** PM: Peso Molecular

**Fonte:** Visse R *et al.*, Seltzer JL *et al.*, Nagase H *et al.* (6, 47, 74)

O principal componente de todas as membranas basais, representando 40 a 65% de toda a proteína, é o colágeno tipo IV. As colagenases intersticiais não são capazes de clivar tal colágeno, enquanto que as estromelinas o fazem apenas parcialmente (47). Salo *et al.*, em 1983, foram os primeiros a descreverem uma MMP capaz de clivar a porção helicoidal do colágeno tipo IV em vários fragmentos. O experimento foi conduzido em cultura celular para melanoma (81).

### **8.6. Metaloproteinase da matriz tipo 2 (MMP-2)**

Em 1972, Harris e Krane observaram atividade de gelatinase em tecido sinovial reumatóide (67), atividade a qual, retrospectivamente, tratava-se possivelmente de gelatinase A (MMP-2) (7). Mais tarde, Salo *et al.*, observaram enzima similar em tumor de rato que digeriu colágeno tipo IV da membrana basal (81). Isto levou a designação inicial da enzima como sendo colagenase tipo 4, uma denominação que caiu em desuso à medida que outras MMPs capazes de digerir esse mesmo substrato foram sendo descobertas. Outro nome comumente encontrado é gelatinase de 72kDa e, mais raramente, CLG4A (7).

A MMP-2, classificada como EC 3.4.24.24 (82), tem uma afinidade por substrato protéico com estrutura primária colagenosa e parece ser a enzima responsável pela degradação completa do colágeno após a clivagem pela colagenase intersticial. A MMP-2 digere a gelatina com velocidade superior a cem vezes à colagenase intersticial e rapidamente cliva os peptídeos dos colágenos em estruturas tão pequenas quanto resíduos de seis aminoácidos (83).

A MMP-2, assim como a MMP-9, é codificada por genes que possuem 13 exons, 3 a mais do que as demais MMPs, devido à presença exclusiva do domínio da fibronectina (84, 85). O locus da MMP-2 encontra-se no cromossomo 16: 16q21 segundo Fan *et al.* (86) ou 16q12 segundo Becker-Follmann *et al.* (87).

A MMP-2 é sintetizada e secretada como uma pré-enzima (6,7,47,73,74).

Ao contrário do que ocorre com a MMP-9, a maior parte do processo de ativação ocorre em nível pós-transcricional (nível protéico). A MMP-2 pode se auto-ativar, levando à formação de múltiplos produtos menores. Acredita-se que sua via de ativação mais importante seja através da ligação com MT1-MMP (47).

Uma mutação no gene que codifica a MMP-2, transmitida de forma autossômica recessiva, resultando na ausência da enzima ativa, foi recentemente encontrada em três famílias árabes. Os pacientes acometidos apresentavam artrite associada com osteólise multicêntrica (88).

### **8.7. Metaloproteinase da matriz tipo 9 (MMP-9)**

A gelatinase B (MMP-9), enzima EC 3.4.24.35 (64), apresenta uma estrutura primária com todos os elementos da MMP-2, com um domínio adicional único de 54 aminoácidos ricos em prolina, homólogo à cadeia  $\alpha 2$  do colágeno tipo V, inserido próximo ao domínio do centro ativo ligador de zinco (47). É a maior das MMPs (7).

Uma gelatinase oriunda de leucócitos polimorfonucleares humanos foi descrita por Sopata *et al.* (68). Ela era uma forma latente ativada por agentes mercuriais (89). Mais tarde, a enzima foi purificada e caracterizada (90,91) e sua seqüência gênica caracterizada (92).

Apesar do *locus* da MMP-9 inicialmente ter sido descrito como sendo no cromossomo 16 (92), sua localização, mais provável é no cromossomo 20 (20q11.2-q13.1) (93).

A MMP-9 é fortemente regulada em nível transcripcional. Fatores de crescimento, citocinas, moléculas de adesão célula-célula e célula-MEC são os agentes conhecidos mais importantes envolvidos em seu controle (7,47).

Embora a MMP-9 digira proteínas semelhantes à MMP-2 (tabela IV), análise enzimática cuidadosa mostra diferenças em suas especificidades. A MMP-2 é duas vezes mais ativa contra a

gelatina I em comparação com a MMP-9. Esta, por outro lado, digere o colágeno tipo IV, duas ou três vezes mais rapidamente que a MMP-2 (94).

Uma particularidade do grupo das gelatinases é que ambas as pró-enzimas são secretadas depois de complexadas a um inibidor específico de MMP (7, 47, 74).

Parte das moléculas de pró-gelatinase B secretada é covalentemente ligada ao nível da terminação carboxil com o inibidor tissular de MMP. Tal inibidor é usualmente designado como TIMP-1 (do inglês: *tissue inhibitor of metalloproteinase*) (6,7).

A pró-gelatinase A é complexada de forma semelhante com o TIMP-2 (7).

### **8.8. Metaloproteinase da matriz -2 e -9 em neoplasias**

O papel de vários tipos de metaloproteinases, incluindo as MMPs -2 e -9 na fisiopatologia de inúmeras neoplasias tem sido objeto atual de discussão (8-12, 47, 48, 50, 95-148).

Há inúmeras frentes de estudo neste campo. Tenta-se correlacioná-las como fator prognóstico (10, 115, 125, 141, 143), diagnóstico (97) e alvo terapêutico (12). A expressão das MMPs pode ser medida por hibridização *in situ* (140, 146), imunistoquímica (103, 105, 140, 149), zimografia (131), Western-blotting (130), Northern blot (130, 146), citometria de fluxo (150), radioisótopos (151), ELISA (97, 152) e reação de polimerase em cadeia (128, 130). Cada uma dessas técnicas apresenta vantagens e limitações. A imunistoquímica é técnica de fácil execução capaz de localizar a MMP no tecido estudado bem como em que parte da célula ela se encontra. Entretanto, geralmente não diferencia a pró-enzima da enzima ativada (136).

Tem-se estudado essas MMPs em: carcinoma espinocelular oral (144); carcinoma de glândula salivar (153); sarcoma de Kaposi (112); câncer de mama (115, 122, 125); câncer de pâncreas (107); hepatocarcinoma (113); câncer de próstata (106, 140); carcinoma gástrico (95,

96); câncer coloretal (97, 99, 124); câncer de endométrio (132); carcinoma de bexiga (102, 134); carcinoma de rim (126) câncer de pulmão (142); colangiocarcinoma (117); câncer de ovário (123); câncer de colo uterino (143, 147); câncer de pênis (141); tumores de laringe (110); câncer de hipófise (127); meningiomas (114, 154); mola hidatiforme (155); câncer de tireóide (156) e paratireóide (157); câncer de vulva (158); osteossarcoma (159); lipossarcoma (160); rabdomiossarcoma (161); sarcoma sinovial (162) leucemias (101) e em melanomas, tanto de úvea (163) quanto cutâneo (9).

As MMPs podem agir de várias formas no processo de disseminação de tumores (135). Por mediarem a degradação da matriz extracelular (MEC) e da membrana basal, podem atuar em fases precoces do processo de tumorigênese, contribuindo para a formação de um microambiente que promova o crescimento tumoral. As MMPs também participam em estágios mais tardios do desenvolvimento do câncer, promovendo o crescimento sustentado tanto de tumores primários quanto metastáticos pela ativação de fatores de crescimento, inativação de proteínas de ligação a fatores de crescimento ou pela liberação de moléculas mitogênicas residentes na MEC (164). As MMPs apresentam ainda papel na neo-angiogênese tumoral bem como no controle da apoptose, como será discutido posteriormente (135).

### **8.9. Metaloproteinase da matriz -2 e - 9 no melanoma cutâneo**

A invasão estromal de células tumorais, bem como a formação de metástases, é um processo complexo que envolve o destacamento de células neoplásicas do tumor primário, rompimento da membrana basal, invasão do tecido estromal peritumoral, intravasamento para a circulação linfática ou sanguínea e, finalmente, extravasamento para órgãos distantes para formar um segundo tumor. A degradação e remodelamento da MEC e membrana basal por enzimas proteolíticas são essenciais nesse processo (9).

Dentre todas as MMPs, as que parecem estar mais relacionadas com a fisiopatologia do melanoma incluem: MMP-1, MMP-2, MMP-9, MMP-13 e MT1-MMP, bem como seus inibidores tissulares TIMP-1, TIMP-2 e TIMP-3 (9).

Há quase 30 anos, Liotta *et al.* já haviam descrito que a atividade de uma enzima capaz de degradar o colágeno tipo IV (principal componente da membrana basal) se correlacionava com a capacidade metastática de células de cultura de melanoma (120). Estudos posteriores em tais culturas demonstraram que a MMP-2 desempenhava papel fundamental na invasão do melanoma (9, 135, 136).

Väisänen *et al.* mediram de forma semi-quantitativa a expressão imunoistoquímica da MMP-2 em 50 lesões de melanoma cutâneo primário. Os pesquisadores acompanharam esses 50 pacientes por um período mínimo de 10 anos e concluíram que a MMP-2 representava um fator prognóstico independente. Nesse estudo, não houve relação entre MMP-2, Breslow e Clark, mas pessoas do sexo masculino expressavam mais a enzima (10).

Em 1999, Hofmann *et al.* (130) além de Kurschat *et al.* (121) demonstraram a associação do aumento da expressão da MMP-2 com a progressão do melanoma. Pouco tempo antes, já havia sido demonstrado que a atividade da MMP-2 modularia a adesão celular bem como a disseminação tumoral para componentes da MEC (109).

A expressão imunoistoquímica da MMP-2, -9 foi investigada no melanoma *in situ*, melanoma invasor, nevo de Spitz, nevo atípico (“displásico”) e nevo melanocítico benigno por Simonetti *et al.* . A MMP-9 expressou-se apenas em lesões malignas, tanto invasoras quanto *in situ*. Todas as lesões malignas expressaram MMP-2, assim como algumas benignas, porém estas geralmente expressavam-na de forma fraca (103).

Walker e Woolley investigaram por imunoistoquímica a distribuição tissular das MMPs - 1, -2 e -3 em 10 lesões de melanoma de espalhamento superficial e 8 melanomas nodulares (148). A expressão foi obtida de forma semi-quantitativa variando de (-) para ausência de expressão, (+) para expressão leve, (++) para expressão moderada até (+++) para expressão

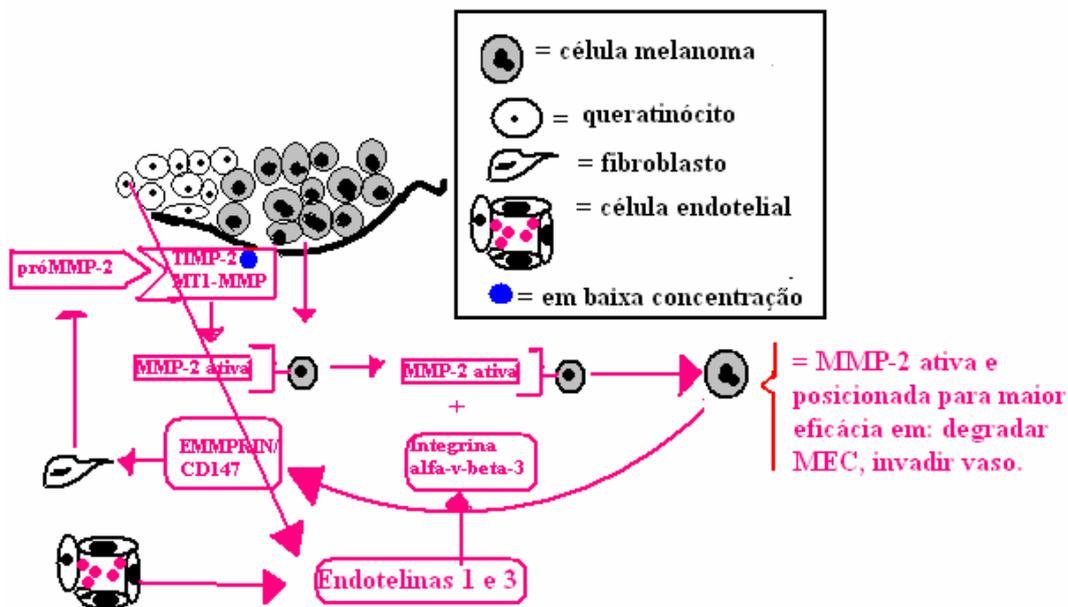
forte. As MMPs estavam ausentes na pele “normal” distante do tumor. A MMP-2 estava localizada em discretos ninhos de melanoma, mais evidente na interface epiderme-tumor (e em menor grau em pequenos grupos de células da resposta inflamatória do hospedeiro). Algumas células epidérmicas adjacentes às células de melanoma coradas apresentavam também coloração fraca para MMP-2. A resposta do hospedeiro foi geralmente mais pronunciada no melanoma de espalhamento superficial, onde as células observadas incluíam mastócitos, macrófagos, linfócitos. O número de células específicas e sua distribuição variaram entre e dentro de cada espécie de melanoma. Aparentemente, não houve correlação entre a presença de células inflamatórias e os locais de expressão das MMPs. Não houve nenhuma correlação entre a expressão das MMPs e o nível de Clark. Entretanto, os autores sugerem novos estudos com um número maior de casos para análises estatísticas mais adequadas (148).

Van den Oord *et al.* investigaram a distribuição da MMP-9 e EMMPRIN (indutor de MMP) em 33 lesões pigmentadas benignas e 41 lesões de melanoma (98). O nevo azul não expressava MMP-9, mas sim EMMPRIN. Outras lesões benignas não expressavam nenhuma das enzimas. No melanoma, tanto a MMP-9 quanto o EMMPRIN estavam expressas de forma variável em lesões em fase de crescimento horizontal, mas não em fase de crescimento vertical. Todos os casos de lentigo maligno e lesões metastáticas foram negativos. Os autores concluíram que a invasão inicial do melanoma estaria associada à expressão *de novo* da MMP-9 e EMMPRIN (98).

Durante a evolução do melanoma, a MMP-2 é secretada em sua forma inativa (pró-MMP-2) por células como fibroblastos normais frente a estímulos como EMMPRIN/CD147 produzido por células do melanoma. A pró-MMP-2 é ativada pelo complexo TIMP-2/MT1-MMP. A MMP-2 é então posicionada, com o auxílio da integrina  $\alpha_v \beta_3$ , de tal forma na superfície da célula do melanoma que garanta maior eficácia na degradação da MEC e invasão vascular (figura II) (8).

Endotelinas (ETs) são um grupo de peptídeos vasoconstrictores produzidos por vários tecidos, incluindo o epitélio vascular (165). Seu papel na fisiopatologia de neoplasias, incluindo o melanoma, tem sido elucidado. A expressão do receptor para ET ETbR está aumentada em células de melanoma em comparação com células névicas benignas. A ligação da ET com seu receptor parece ter papel anti-apoptótico. Além disso, ET-1 e ET-3 aumentam a expressão das integrinas  $\alpha_v\beta_3$  facilitando a atividade da MMP-2 (166).

Em modelo de camundongo, a localização da MMP-2 ativa restringe-se à interface tumor/estroma do melanoma subcutâneo (100).



**Figura II - Principais interações entre MMP-2 e Melanoma**

Após o rompimento da membrana basal e escape de células tumorais individuais do tumor primário, há necessidade de fatores quimiotáticos e de polarização para estas atingirem os vasos sanguíneos. O Fator de Crescimento Epidérmico (EGF) produzido por macrófagos e o Fator Estimulante de Colônias de Macrófagos (CSF-1) provavelmente estão envolvidos (167). Não se sabe ainda o papel das MMPs nesse contexto específico de quimiotaxia, embora certamente elas desempenhem alguma função (135).

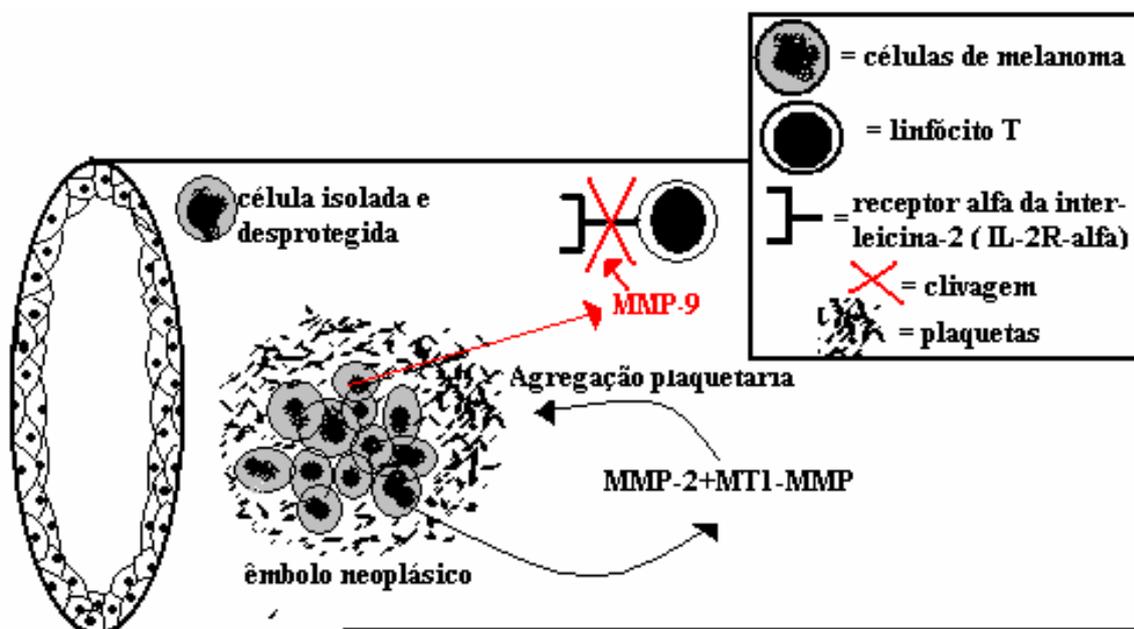
Denomina-se intravasamento a entrada de células tumorais nos vasos sanguíneos e linfáticos (135). Há poucos e conflitantes estudos envolvendo intravasamento de células de melanoma. Parece ser mais eficiente em vasos angiogênicos do que em pré-formados, isso porque os vasos induzidos por tumores são dilatados, não apresentam fluxo sanguíneo e não estão revestidos continuamente por membrana basal e pericitos. Todas essas características facilitariam a entrada de células tumorais para o seu interior (135, 138).

Após o intravasamento, as células neoplásicas migram pelo sistema vascular até os capilares do órgão secundário. Pouco se sabe sobre os mecanismos dessa migração, mas a habilidade da célula deformar-se através dos capilares parece ser importante (168).

Para as células tumorais, a circulação sanguínea é um meio hostil onde elas enfrentam toxicidade sérica, deformação mecânica, além de ataques imunes (135). Essas células adquirem vários mecanismos (incluindo o uso de MMPs) para enfrentar a resposta imune. A proliferação de linfócitos T, que é regulada pela sinalização de citocinas através do receptor alfa da interleucina-2 ( $IL-2R\alpha$ ), pode ser inibida pela clivagem deste receptor pela MMP-9 (105, 164).

As células tumorais estão nos vasos em grupos ou êmbolos. Nesses êmbolos, elas estão mais protegidas do que se estivessem isoladas (169). O papel das MMPs na formação desses êmbolos ainda é desconhecido (fig. III) (135).

Um mecanismo facilitador de embolização vascular e metástases é a agregação plaquetária em torno do êmbolo de células neoplásicas induzida pelo tumor. Tal agregação depende da ativação da MMP-2 mediada por MT1-MMP (170). Admite-se, embora faltem ainda evidências conclusivas, que o envoltório de plaquetas serviria como um escudo para o êmbolo tumoral, dificultando assim o acesso e portanto o reconhecimento e a destruição da célula tumoral por células de defesa (quer do sistema inato quanto adaptativo) (fig. III) (165).



**Figura III: Migração das células neoplásicas pelos vasos**

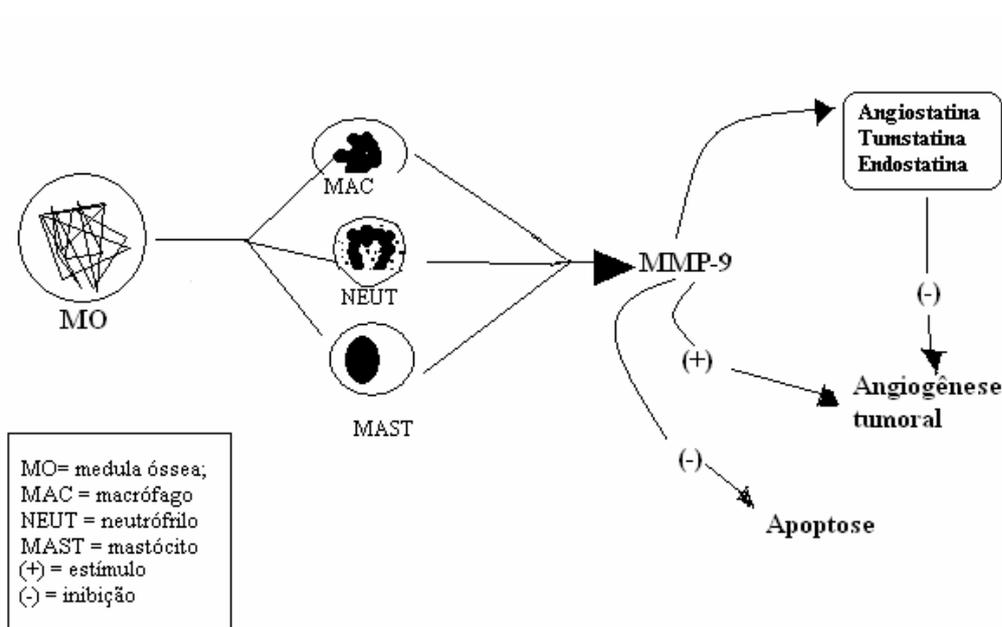
Os capilares pulmonares e hepáticos são muito eficientes em reter células tumorais (139). O processo de adesão à microvasculatura é mediado, principalmente, por selectinas para a ligação célula tumoral/célula endotelial e por integrinas para célula tumoral/MEC (129).

A proliferação intravascular das células tumorais aderidas ao vaso freqüentemente precede ao extravasamento. O papel dessas MMPs nesta proliferação ainda é desconhecido (135).

A MMP-9 parece estar expressa em melanomas primários em fase de crescimento horizontal (9, 74, 98, 146). Mac Dougall *et al.* demonstraram que a produção de MMP-9 induzida pelo tratamento de células derivadas de melanoma avançado com interleucina-1 $\beta$  ou fator de necrose tumoral- $\alpha$  vinha acompanhado de uma perda de inibidor tissular (TIMP-1). Por sua vez, linhagens de células menos agressivas submetidas ao mesmo tratamento eram incapazes de produzir MMP-9 mas havia um aumento da TIMP-1. Tais dados podem indicar que a progressão do tumor envolveria um balanço proteolítico entre MMPs e TIMPs (119).

Em modelo animal, verificou-se que em camundongos deficientes de MMP-9 as metástases foram suprimidas (116).

A MMP-9 é ativada por CD44 ou por heterodímeros  $\alpha_v \beta_5$  ou  $\alpha_5 \beta_1$  das integrinas. Em modelo carcinogênico cutâneo murino, a fonte celular fornecedora de MMP-9 são as células inflamatórias, incluindo neutrófilos, macrófagos e mastócitos originados da medula óssea (137). A MMP-9 parece ter papel na angiogênese tumoral (145), podendo tanto inibi-la através da geração de inibidores endógenos como a angiostatina (produzida através da clivagem de plasminogênio), tumstatina (derivada do colágeno tipo IV) e endostatina (fragmento C-terminal da clivagem do colágeno tipo XVIII) (135), quanto estimulá-la através do recrutamento de pericitos (fig.IV) (138).



**Figura IV - Principais interações entre MMP-9 e melanoma**

A MMP-9 apresenta ainda atividade anti-apoptótica *in vitro* e, possivelmente, *in vivo* (118).

Há evidências *in vivo* que não são apenas as células do melanoma em si que produzem as MMPs -2 e -9, mas também as células não neoplásicas dispostas ao redor do processo neoplásico, demonstrando o papel do hospedeiro na progressão da neoplasia (131).

O fato de que a expressão de algumas MMPs, entre elas a MMP-2 ocorreria no melanoma avançado enquanto a MMP-9 estaria limitada a fases mais recentes da neoplasia indica que diferentes classes de MMPs poderiam estar envolvidas na degradação da MEC durante diferentes estágios da evolução da doença (9).

O estudo das MMPs torna-se relevante não apenas na tentativa de desvendar o intrincado comportamento biológico do melanoma, mas também no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas contra a neoplasia. É possível que tratamentos que interfiram pontualmente em MMPs específicas sejam úteis no melanoma, entretanto a baixa efetividade clínica em humanos de vários inibidores sintéticos de MMPs à despeito de resultados excelentes *in vitro* e em modelos animais (particularmente camundongos), reflete a necessidade de mais informações sobre as interações melanoma/hospedeiro, incluindo o papel das MMPs (11, 12, 48).

### **8.10. Tratamentos anti-metaloproteinases**

Estudos pré-clínicos demonstraram que a supressão de alguns tipos de MMPs vinha acompanhada de importante diminuição da progressão de diversas neoplasias, incluindo o melanoma (116).

A partir de tais estudos, em pouco tempo, vários inibidores das MMPs foram produzidos e testados em ensaios clínicos em humanos com glioblastoma (171) câncer de próstata (172), câncer de mama (173) e melanoma cutâneo (49). Entretanto, os resultados da maioria destes estudos têm demonstrado uma baixa efetividade destas medicações (48).

Há várias possíveis explicações para tal discrepância. As MMPs são produzidas principalmente pelas células reativas estromais peritumorais (131). Embora haja exceções (em algumas situações, as MMP-2, 9 e 14 podem se originar do epitélio) (48), há evidências de que a maior parte das MMPs é o resultado da resposta do hospedeiro frente ao tumor. Este fato não foi levado em conta na maioria dos ensaios pré-clínicos já que eles não representam um modelo

adequado da interação tumor *versus* hospedeiro (ser humano) (11,48). Além disso, a maioria dos estudos clínicos envolve pacientes com tumores em estágio avançado, enquanto que grande parte das pesquisas em modelo animal foram realizados em fases iniciais da progressão tumoral (48).

A idéia inicial de que a única função das MMPs seria a de degradar matriz está sendo substituída pelo conceito de MMPs como enzimas responsáveis por uma gama enorme de atividades biológicas (7, 74).

Embora o papel da degradação da matriz seja importante na progressão tumoral, particularmente no que tange a membrana basal, a atuação das MMPs via quimiocinas, fatores de crescimento, receptores de fatores de crescimento, moléculas de adesão e mediadores apoptóticos certamente também o sejam (8).

Drogas anti-MMPs de amplo espectro podem ser inadequadas ao manejo do câncer já que a inibição de algumas MMPs poderia ter um efeito pró-tumorogênico (12).

O futuro dos inibidores das MMPs no tratamento anti-câncer ainda é incerto. É inegável, no entanto, que o conhecimento das interações tumor/hospedeiro tem aumentado muito com o estudo das MMPs e tal conhecimento certamente irá contribuir para um manejo terapêutico mais adequado (11, 100, 108, 135).

## **Anexo I: Estadiamento Patológico do Melanoma Cutâneo (pTNM)**

### **Primary Tumor (pT)**

- pTX: Primary tumor cannot be assessed  
 pT0: No evidence of primary tumor  
 pTis: Melanoma in situ (ie, not an invasive tumor: level I)  
 pT1: Melanoma 1.0 mm or less in thickness, with or without ulceration  
 pT1a: Melanoma 1.0 mm or less in thickness and level II or III, no ulceration  
 pT1b: Melanoma 1.0 mm or less in thickness and level IV or V or with ulceration  
 pT2: Melanoma 1.01 to 2mm in thickness, with or without ulceration  
 pT2a: Melanoma 1.01 to 2.0 mm in thickness, no ulceration  
 pT2b: Melanoma 1.01 to 2.0 mm in thickness, with ulceration  
 pT3: Melanoma 2.01 to 4.0 mm in thickness, with or without ulceration  
 pT3a: Melanoma 2.01 to 4.0 mm in thickness, no ulceration  
 pT3b: Melanoma 2.01 to 4.0 mm in thickness, with ulceration  
 pT4: Melanoma greater than 4.0 mm in thickness, with or without ulceration  
 pT4a Melanoma greater than 4.0 mm in thickness, no ulceration  
 pT4b Melanoma greater than 4.0 mm in thickness, with ulceration

### **Regional Lymph Nodes (pN)**

- pNX: Regional lymph nodes cannot be assessed  
 pN0: No regional lymph node metastasis  
 pN1: Metastasis in 1 regional lymph node  
 pN1a: Clinically occult (microscopic) metastasis  
 pN1b: Clinically apparent (macroscopic) metastasis  
 pN2: Metastasis in 2 to 3 regional nodes or intra-lymphatic regional metastasis without nodal metastasis  
 pN2a: Clinically occult (microscopic) metastasis  
 pN2b: Clinically apparent (macroscopic) metastasis  
 pN2c: Satellite or in-transit metastasis without nodal metastasis  
 pN3: Metastasis in 4 or more regional lymph nodes, or matted metastatic nodes, or in-transit metastasis or satellites(s) with metastasis in regional node(s)  
 Number identified: \_\_\_\_\_  
 Number containing metastases identified macroscopically: \_\_\_\_\_  
 Number containing metastases identified microscopically: \_\_\_\_\_  
 Matted nodes:  
 Present  
 Absent

### **Distant Metastasis (pM)**

- pMX: Presence of distant metastasis cannot be assessed  
 pM1: Distant metastasis (documented in this specimen)  
 pM1a: Metastasis in skin, subcutaneous tissues, or distant lymph nodes  
 pM1b: Metastasis to lung  
 pM1c: Metastasis to all other visceral sites or distant metastasis at any site associated with an elevated serum lactic dehydrogenase (LDH)  
 (Other site, specify: \_\_\_\_\_)

**Fonte:** College of American Pathologists [homepage na Internet]. Illinois: The Association; c2001- 2007 [atualizada em 16/07/2007; acesso em 28/07/2007]. Melanoma of the Skin: Protocol applies to melanoma of cutaneous surfaces only; [7 telas]. Disponível em [http://www.cap.org/apps/docs/cancer\\_protocols/2005/skinmelanoma05\\_pw.pdf](http://www.cap.org/apps/docs/cancer_protocols/2005/skinmelanoma05_pw.pdf). (45)

## Anexo II: Melanoma Cutâneo: Grupamento por estádios TNM

### Grupamento por Estádios

Estádio 0	pTis	N0	M0
Estádio I	pT1	N0	M0
Estádio IA	pT1a	N0	M0
Estádio IB	pT1b	N0	M0
	PT2a	N0	M0
Estádio IIA	pT2b	N0	M0
	pT3a	N0	M0
Estádio IIB	pT3b	N0	M0
	PT4a	N0	M0
Estádio IIC	pT4b	N0	M0
Estádio III	Qualquer pT	N1, N2, N3	M0
Estádio IIIA	pT1a-4a	N1a, 2a	M0
Estádio IIIB	pT1a-4a	N1b, 2b, 2c	M0
	PT1b-4b	N1a, 2a, 2c	M0
Estádio IIIC	pT1b-4b	N1b, 2b	M0
	Qualquer pT	N3	M0
Estádio IV	Qualquer pT	Qualquer N	M1

**Fonte:** Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Melanoma Maligno da Pele (CID-O C44, C51.0, C60.9, C63.2): Regras para Classificação. In: TNM: classificação de tumores malignos. 6 ed. Rio de Janeiro. p132-136. (43).

## **9. OBJETIVOS:**

### **Objetivo Principal:**

Avaliar a expressão imunoistoquímica das MMPs -2 e -9 em lesões de melanoma cutâneo primário.

### **Objetivos Secundários:**

Associar a expressão imunoistoquímica das MMPs -2 e -9 no endotélio, estroma peritumoral e células neoplásicas com as características histopatológicas mais utilizadas em dermatopatologia do melanoma: presença ou ausência de infiltrado inflamatório linfocítico intra ou peritumoral, presença ou ausência de áreas de regressão histológica espontânea, presença ou ausência de ulceração microscópica, subtipo histológico bem como o sexo do indivíduo. Correlacionar tal expressão com o nível de Clark, espessura de Breslow e índice mitótico.

## 10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. Langley RGB, Barnhill RL, Jr, Mihm MC, Fitzpatrick TB, Sober AJ. Neoplasms: Cutaneous Melanoma. In: Freedberg IM EA, Wolff K, Goldsmith LA, Katz SI, editores. Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine. 6ª ed. Estados Unidos da América: Mc Graw-Hill; 2003. p. 917-47.
2. Instituto Nacional de Câncer [homepage na Internet]. Brasil. Incidência de Casos no Brasil: Síntese de Resultados e Comentários. [acesso em 24/06/2007] Disponível em: [http://www.inca.gov.br/estimativa/2006/index.asp?link=conteudo\\_view.asp&ID=5](http://www.inca.gov.br/estimativa/2006/index.asp?link=conteudo_view.asp&ID=5).
3. Markovic SN, Ericson LA, Rao RD, Weenig RH, Pockaj BA, Bardia A, et al. Malignant melanoma in the 21st century, part 1: epidemiology, risk factors, screening, prevention, and diagnosis. *Mayo Clin Proc* 2007;82(3):364-80.
4. Thompson JK Scolyer RA, Kefford RF. Cutaneous melanoma. *Lancet* 2005;365(9460):687-701.
5. Miller JA, Mihm Jr. MC. Melanoma. *N Eng J Med* 2006;355(1):51-65.
6. Visse R, Nagasi H. Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases: Structure, Function, and Biochemistry. *Circ Res* 2003;92:827-39.
7. J Frederick W, Nagasi H. Matrix Metalloproteinases and TIMPs. 1ª ed: Oxford University Press; 2002.
8. Hofmann UB, Houben R, Bröcker EB, Becker JC. Role of matrix metalloproteinases in melanoma cell invasion. *Biochimie* 2005;87:307-14.
9. Hofmann UB, Westphal JR, van Muijen GNP, Ruitter DJ. Matrix Metalloproteinases in Human Melanoma. *J Invest Dermatol* 2000;115(3):337-44.
10. Väisänen A, Kallioinen M, Taskinen PJ, Turpeenniemi-Hujanen T. Prognostic value of MMP-2 immunoreactive protein (72 kD type IV collagenase) in primary skin melanoma. *J Pathol* 1998;186(1):51-8.

11. Fisher JD, Mobashery S. Recent advances in MMP inhibitor design. *Cancer Metastasis Rev* 2006;25:115-36.
12. Overall CM, Kleinfeld O. Validating matrix metalloproteinases as drug targets and anti-targets for cancer therapy. *Nature* 2006;6:227-39.
13. Rachou AMS, Curado MP, Latorre MRDO. Melanoma Cutâneo: estudo de base populacional em Goiânia, Brasil, de 1988 a 2000. *An Bras Dermatol* 2006;81(5):449-55.
14. Lapa MS, Guedes KF, Schalch FO, Landman G. Melanomas malignos cutâneos tratados no Hospital do Câncer de São Paulo: estudo retrospectivo para avaliação de distribuição, fatores prognósticos e sobrevida. *An Bras Dermatol* 2002;77(3):313-20.
15. Bakos L, Wagner M, Bakos RM, Leite CSM, Sperhacke CL, Dzekaniak, et al. Sunburn, sunscreens, and phenotypes: some risk factors for cutaneous melanoma in southern Brazil. *Int J Dermatol* 2002;41:557-62.
16. Fortes C, Mastroeni S, Melchi F, Pilla MA, Alotto M, Antonelli G, et al. The association between residential pesticide use and cutaneous melanoma. *Eur J Cancer* 2007;43(6): 1066-75.
17. Zanetti R, Loria D, Rosso S. Melanoma, Parkinson's disease and levodopa: causal or spurious link? A review of the literature. *Melanoma Res* 2006;16(3):201-6.
18. Zanetti R, Rosso S. Levodopa and the risk of melanoma. *Lancet* 2007;369(9558):257-8.
19. Kraemer KH, Lee MM, Scotto J. Xeroderma pigmentosum. Cutaneous, ocular, and neurologic abnormalities in 830 published cases. *Arch Dermatol* 1987;123(2):241-50.
20. Barnhill RL. Pathology of Malignant Melanoma. 1<sup>a</sup> ed. New York: Springer; 2004.
21. Gruber SB, Barnhill RL, Stenn KS, Roush GC. Nevomelanocytic proliferations in association with cutaneous malignant melanoma: a multivariate analysis. *J Am Acad Dermatol* 1989;21:773-80.

22. Posther KE, Selim MA, Mosca PJ, Stanley WE, Johnson JL, Tyler DS, et al. Histopathologic characteristics, recurrence patterns, and survival of 129 patients with desmoplastic melanoma. *Ann Surg Oncol* 2006;13(5):728-39.
23. Lin D, Kashani-Sabet M, McCalmont T, Singer MI. Neurotropic melanoma invading the inferior alveolar nerve. *J Am Acad Dermatol* 2005;53(2):S120-S2.
24. Top H, Aygit AC, Bas S, Yalcin O. Spitzoid melanoma in childhood. *Eur J Dermatol* 2006;16(3):276-80.
25. Kato N, Tamura A, Yamanaka Y, Tanimura S, Minakawa H. Malignant blue nevus: case report of a Japanese man with a distant cutaneous metastasis. *Am J Dermatopathol* 2007;29(1):88-91.
26. Arroyo MP, Chu DH, Mobini N, Park HS. Verrucous plaque on the foot. *J Cutan Pathol* 2004;31(3):271-3.
27. Cuellar FA, Vilalta A, Rull R, Vidal-Sicart S, Palou J, Ventura PJ, et al. Small cell melanoma and ulceration as predictors of positive sentinel lymph node in malignant melanoma patients. *Melanoma Res* 2004;14(4):277-82.
28. Kao GF, Helwig EB, Graham JH. Balloon cell malignant melanoma of the skin. A clinicopathologic study of 34 cases with histochemical, immunohistochemical, and ultrastructural observations. *Cancer* 1992;69:2942-52.
29. Sheibani K, Battifora H. Signet-ring cell melanoma. A rare morphologic variant of malignant melanoma. *Am J Surg Pathol* 1988;12:28-34.
30. Abbott JJ, Armirkhan RH, Hoang MP. Malignant melanoma with a rhabdoid phenotype: histologic, immunohistochemical, and ultrastructural study of a case and review of the literature. *Arch Pathol Lab Med* 2004;128(6):686-8.
31. Patel P, Levin K, Waltz K, Helm KF. Myxoid melanoma: immunohistochemical studies and a review of the literature. *J Am Acad Dermatol* 2002;46(2):264-70.

32. Swetter SM, Ecker PM, Johnson DL, Harvell JD. Primary dermal melanoma: a distinct subtype of melanoma. *Arch Dermatol* 2004;140(1):99-103.
33. Lucas DR, Tazelaar HD, Unni KK, Wold LE, Okada K, Dimarzio DJ Jr, et al. Osteogenic melanoma. A rare variant of malignant melanoma. *Am J Surg Pathol* 1993;17(4):400-9.
34. Rodriguez J, Nonaka D, Kuhn E, Reichel M, Rosai J. Combined high-grade basal cell carcinoma and malignant melanoma of the skin ("malignant basomelanocytic tumor"): report of two cases and review of the literature. *Am J Dermatopathol* 2005;27(4):314-8.
35. Dim DC, Cooley LD, Miranda RN. Clear cell sarcoma of tendons and aponeuroses: a review. *Arch Pathol Lab Med* 2007;131(1):152-6.
36. Hutchinson J. Senile freckle with deep staining - a superficial epithelioma of the cheek. *Arch Surg* 1892;3:159.
37. Dubreuilh MW. De la mélanose circonscrite précancéreuse. *Ann Dermatol Syphiligr* 1912;3:129-51.
38. Rocamora V, Puig L, Romani J de Moragas JM. Amelanotic lentigo maligna melanoma: report of a case and review of the literature. *Cutis* 1999;64(1):53-6.
39. Maia M, Russo C, Ferrari N, Ribeiro MCSA. Melanoma acrolentiginoso: um desafio ao diagnóstico precoce. *An Bras Dermatol* 2003;78(5):553-60.
40. Riccardi F, Furian R, Santos AP, Rey MCW, Silva BMD. Melanoma Cutâneo: série consecutiva de 183 pacientes tratados em centro de referência. *An Bras Dermatol* 2006;81(2):S141.
41. Breslow A. Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. *Ann Surg* 1970;172:902-8.
42. Clark W, From L, Bernardino EA, Mihm MC. The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin. *Cancer Res* 1969;29:705-27.

43. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Melanoma Maligno da Pele (CID-O C44, C51.0, C60.9, C63.2): Regras para classificação. In: TNM: classificação de tumores malignos. 6ª ed. Rio de Janeiro; 2004. p. 132-136.
44. Balch CM, Buzaid AC, Soong SJ, Atkins MB, Cascinelli N, Coit DG, et al. Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. *J Clin Oncol* 2001;19 (16):3635-48.
45. College of American Pathologists [homepage na Internet]. Illinois: The Association;c2001-2007 [atualizada em 16/07/2007; acesso em 28/07/2007].Melanoma of the Skin: Protocol applies to melanoma of cutaneous surfaces only;[7 telas]. Disponível em [http://www.cap.org/apps/docs/cancer\\_protocols/2005/skinmelanoma05\\_pw.pdf](http://www.cap.org/apps/docs/cancer_protocols/2005/skinmelanoma05_pw.pdf).
46. Bacchi CE, Almeida PCC, Franco M. Manual de Padronização de Laudos Histopatológicos. 3ª ed. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia; 2005.
47. Seltzer JL, Eisen AZ. The Role of Extracellular Matrix Metalloproteins in Connective Tissue Remodeling. In: Freedberg IM, Eisen AZ, Wolff K, Goldsmith LA, Katz SI, editores. *Dermatology in General Medicine*. 6ª ed. Estados Unidos da América: McGraw-Hill; 2003 p. 200-209.
48. Coussens LM, Fingleton B, Matrisian LM. Matrix Metalloproteinase Inhibitor and Cancer: Trials and Tribulations. *Science* 2002;295:2387-92.
49. Quirt I, Bodurth A, Lohmann R, Rusthoven J, Belanger K, Young V, et al. Phase II study of marimastat (BB-2516) in malignant melanoma: a clinical and tumor biopsy study of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *Invest New Drugs* 2002;20(4):431-7.
50. Zigrino P, Loffek S, Mauch C. Tumor-stroma interactions: their role in the control of tumor cell invasion. *Biochimie* 2005;87(3-4):321-8.

51. Malignant Melanoma. In: Rosai J. Rosai and Ackerman's Surgical Pathology. 9<sup>a</sup> ed. New York. Elsevier; 2004 p164-176.
52. Chang AE, Karnell LH, Menck HR. The National Cancer Data Base report on cutaneous and noncutaneous melanoma: a summary of 84,836 cases from the past decade. *Cancer* 1998;83:1664-78.
53. Cox NH, Aitchison TC, Sirel JM, MacKie RM. Scottish Melanoma Group. Comparison between lentigo maligna melanoma and other histogenetic types of malignant melanoma of the head and neck. *Br J Cancer* 1996;73:940-4.
54. Bernstein EF, Brown DB, Takeuchi T, Sung K, Kong B, Uitto J. Evaluation of sunscreens with various sun protection factors in a new transgenic mouse model of cutaneous photoaging that measures elastin promoter activation. *J Am Acad Dermatol* 1997;37:725-9.
55. Gromet MA, Epstein WL, Blois MS. The regressing thin malignant melanoma. A distinctive lesion with metastatic potential. *Cancer* 1978;42:2282-92.
56. Massi D, Franchi A, Borgognoni L, Reali UM, Santucci M. Thin cutaneous malignant melanomas (< or = 1.5 mm): identification of risk factors indicative of progression. *Cancer* 1999;85(5):1067-76.
57. Mangini J, Li N, Bhawan J. Immunohistochemical Markers of Melanocytic Lesions: A Review of Their Diagnostic Usefulness. *Am J Dermatopathol* 2002;24(3):270-81.
58. Salvio AG, Marques MEA. Imuno-histoquímica para identificação de células neoplásicas no infiltrado ativo de melanomas finos. *J Bras Patol Med Lab* 2006;42(2):143-8.
59. Grupo Multicêntrico e Multidisciplinar Brasileiro para Estudo do Melanoma (GBM). Consenso para o laudo anatomopatológico par ao melanoma cutâneo. Melanoma Boletim Informativo do GBM [periódico na Internet].2003 [acesso em 23/06/2007 [aproximadamente 7p.]. Disponível em: <http://www.gbm.org.br/gbm/boletim/2003/infor23.aspx>

60. Francken AB, Shaw HM, Thompson JF, Soong SJ, Accortt NA, Azzola MF, et al. The Prognostic Importance of Tumor Mitotic Rate Confirmed in 1317 Patients With Primary Cutaneous Melanoma and Long Follow-Up. *Ann Surg Oncol* 426-33 2004;11(4):426-33.
61. Balch CM, Wilkerson JA, Murad TM, Soong SJ, Ingalls AL, Maddox WA. The prognostic significance of ulceration of cutaneous melanoma. *Cancer* 1980;45(12):3012-7.
62. Abramova L, Slingluff CL, Patterson JW. Problems in the interpretation of apparent "radial growth phase" malignant melanomas that metastasize. *J Cutan Pathol* 2002;29q:407-14.
63. Moss GP, Road ME. Recommendations on Biochemical & Organic Nomenclature, Symbols & Terminology etc. [homepage na Internet]. Londres. Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB) [atualizada em 24/06/2006; acesso em 27/06/2007] Historical Introduction [4 telas]. Disponível em: <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/history.html>.
64. Moss GP, Road ME. Recommendations on Biochemical & Organic Nomenclature, Symbols & Terminology etc. [homepage na Internet] London. International Union of Biochemistry and Molecular Biology. [atualizada em 24/07/2006; acesso em 27/06/2007]. Disponível em: <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb>.
65. Gross J, Lapière CM. Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. *Proc Natl Acad Sci USA* 1962;48:1014-22.
66. Eisen AZ, Jeffrey JJ, Gross J. Human skin collagenase. Isolation and mechanism of attack on the collagen molecule. *Biochim Biophys Acta* 1968;151(3):637-45.
67. Harris ED, Krane SM. An endopeptidase from rheumatoid synovial tissue culture. *Biochem Biophys ACTA* 1972;258:566-76.
68. Sopata I, Dancewicz AM. Presence of a gelatin-specific proteinase and its latent form in human leucocytes. *Biochem Biophys ACTA* 1974;370:510-23.

69. Nagase H, Barret AJ, Woessner Jr. JF. Nomenclature and glossary of matrix metalloproteinases. *Matrix* 1992;1:421-4.
70. Moss GP, Road ME. Recommendations on Biochemical & Organic Nomenclature, Symbols & Terminology etc. [homepage na Internet]. London Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB) [atualizada em 24/07/2006; acesso em 27/06/2007] EC 3.4.24 Metalloendopeptidases [3 telas]. Disponível em: <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC3/4/24/>.
71. Neurath H. The Diversity of Proteolytic Enzymes. In: Beynon RJ, Bond JS, editores. *Proteolytic enzymes: a practical approach*. 1ª ed. Oxford University Press. 1996. Estados Unidos da América. p.1-13
72. Uniprot: the universal protein resource [homepage na Internet] European Bioinformatics Institute, Swiss Institute of Bioinformatics, Georgetown University c2002-. [acesso em 26/06/2007]. Disponível em <http://www.uniprot.org>.
73. The UniProt Consortium. The Universal Protein Resource (UniProt). *Nucleic Acids Res* 2007;35:193-7.
74. Nagase H, Woessner JF. Matrix Metalloproteinases. *J Biol Chem* 1999;274 (31):21491-4.
75. Parks WC, Mecham RP. Matrix metalloproteinases. 1ª ed. San Diego: Academic Press; 1998.
76. Sapolsky AI, Howell DS, Woessner JF. Neutral proteases and cathepsin D in human articular cartilage. *J Clin Invest* 1974;53:1044-53.
77. Wilson CL, Matrisian LM. Matrilysin: an epithelial matrix metalloproteinase with potentially novel functions. *Int J Biochem Cell Biol* 1996;28:123-36.

78. Van Wart HE, Birkedal-Hansen H. The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential activity to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:5578-82.
79. Chirco R, Liu X-W, Jung K-K, Kim H-RC. Novel functions of TIMPs in cell signaling. *Cancer Metastasis Rev* 2006;25:99-113.
80. Takahashi C, Sheng Z, Horan TP, Kitayama H, Maki M, Hitomi K, et al. Regulation of matrix metalloproteinase-9 and inhibition of tumor invasion by the membrane-anchored glycoprotein RECK. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95(22):13221-6.
81. Salo T, Liotta LA, Tryggvason K. Purification and characterization of a murine basement membrane collagen-degrading enzyme secreted by metastatic tumor cells. *J Biol Chem* 1983;258(5):3058-63.
82. Moss GP, Road ME. Recommendations on Biochemical & Organic Nomenclature, Symbols & Terminology etc. [homepage na Internet]. London Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB) [atualizada em 24/07/2006; acesso em 27/06/2007]. IUBMB Enzyme Nomenclature EC 3.4.24.24; [1 tela]. Disponível em: <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC3/4/24/24.html>.
83. Sellers A, Reynolds JJ, Meikle MC. Neutral metallo-proteinases of rabbit bone. Separation in latent forms of distinct enzymes that when activated degrade collagen, gelatin and proteoglycans. *Biochem J* 1978;171:493-6.
84. Xia T, Akers K, Eisen AZ, Seltzer JL. Comparison of cleavage site specificity of gelatinases A and B using collagenous peptides. *Biochim Biophys Acta* 1996;1293(2):259-66.
85. Huhtala P, Chow LT, Tryggvason K. Structure of the human type IV collagenase gene. *J Biol Chem* 1990;265:11077-82.
86. Fan Y-S, Eddy RL, Huhtala P, Byers MG, Haley LL, Henry WM, et al. Collagenase type IV (CLG4) is mapped to human chromosome 16q21. *Cytogenet Cell Genet* 1989;51:996.

87. Becker-Follmann J, Gaa A, Bausch E, Natt E, Scherer G, von Deimling O. High-resolution mapping of a linkage group on mouse chromosome 8 conserved on human chromosome 16Q. *Mamm Genome* 1997;8(3):172-7.
88. Martignetti JA, Aqeel AA, Sewairi WA, Boumah CE, Kambouris M, Al Mayouf S, et al. Mutation of the matrix metalloproteinase 2 gene (MMP2) causes a multicentric osteolysis and arthritis syndrome. *Nature Genetics* 2001;28:261-5.
89. Sopata I, Wize J. A latent gelatin specific proteinase of human leucocytes and its activation. *Biochem Biophys ACTA* 1979;571:305-12.
90. Rantala-Ryhänen S, Ryhänen L, Nowak FV, Uitto J. Proteinases in human polymorphonuclear leukocytes. Purification and characterization of an enzyme which cleaves denatured collagen and a synthetic peptide with a Gly-Iie sequence. *Eur J Biochem* 1983;134:129-37.
91. Wilhelm SM, Collier IE, Marmer BL, Eisen AZ, Grant GA, Goldberg GI. SV40-transformed human lung fibroblasts secrete a 92-kDa type IV collagenase which is identical to that secreted by normal human macrophages. *J Biol Chem* 1989;264(29):17213-21.
92. Collier IE, Bruns GA, Goldberg GI, Gerhard DS. On the structure and chromosome location of the 72- and 92-kDa human type IV collagenase genes. *Genomics* 1991;9(3):429-34.
93. Linn R, Dupont BR, Knight CB, Plaetke R, Leach RJ. Reassignment of the 92-kDa type IV collagenase gene (CLG4B) to human chromosome 20. *Cytogenet Cell Genet* 1996;72(2-3):159-61.
94. Xia T, Akers K, Eisen AZ, Seltzer JL. Comparison of cleavage site specificity of gelatinases A and B using collagenous peptides. *Biochim Biophys Acta* 1996;1293(2):259-66.

95. Zheng H, Takahashi H, Murai Y, Cui Z, Nomoto K, Niwa H, et al. Expressions of MMP-2, MMP-9 and VEGF are closely linked to growth, invasion, metastasis and angiogenesis of gastric carcinoma. *Anticancer Research* 2006;26(5A):3579-83.
96. Wu ZY, Li JH, Zhan WH, He YL. Lymph node micrometastasis and its correlation with MMP-2 expression in gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 2006;12(18):2941-4.
97. Wilson S, Wakelam MJ, Hobbs RF, Ryan AV, Dunn JA, Redman VD, et al. Evaluation of the accuracy of serum MMP-9 as a test for colorectal cancer in a primary care population. *BMC Cancer* 2006;6:258.
98. Van den Oord JJ, Peamen L, Opdenakker G, de Wolf Peeters C. Expression of gelatinase B and the extracellular matrix metalloproteinase inducer EMPRIN in benign and malignant pigment cell lesions of the skin. *Am J Pathol* 1997;151:665-70.
99. Unsal Kilic D, Uner A, Akyurek N, Erpolat P, Dursun A, Pak Y. Matrix metalloproteinase-9 expression correlated with tumor response in patients with locally advanced rectal cancer undergoing preoperative chemoradiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2007;67(1):196-203.
100. Hofmann UB, Eggert AAO, Blass K, Brocker AB, Becker JC. Expression of matrix metalloproteinases in the microenvironment of spontaneous and experimental melanoma metastases reflects the requirements for tumor formation. *Cancer Res* 2003;63:8221-25.
101. Stefanidakis M, Koivunen E. Cell-surface association between matrix metalloproteinases and integrins: role of the complexes in leukocyte migration and cancer progression. *Blood* 2006;108(5):1441-50.
102. Staack A, Badendieck S, Schnorr D, Loening SA, Jung K. Combined determination of plasma MMP2, MMP9, and TIMP1 improves the non-invasive detection of transitional cell carcinoma of the bladder. *BMC Urol* 2006;6:19.

103. Simonetti O, Lucarini G, Brancorsini D, Nita P, Bernardini ML, Biagini G, et al. Immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor, matrix metalloproteinase 2, and matrix metalloproteinase 9 in cutaneous melanocytic lesions. *Cancer* 2002;95(9):1963-70.
104. Torabian S, Kashani-Sabet M. Biomarkers for melanoma. *Curr Opin Oncol* 2005;17(2):167-71.
105. Sheu BC, Hsu SM, Ho HN, Lien HC, Huang SC, Lin RH. A novel role of metalloproteinase in cancer-mediated immunosuppression. *Cancer Res* 2001;61(1):237-42.
106. Sfar S, Saad H, Mosbah F, Gabbouj S, Chouchane L. TSP1 and MMP9 genetic variants in sporadic prostate cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 2007;172(1):38-44.
107. Schneiderhan W, Diaz F, Fundel M, Zhou S, Siech M, Hasel C, et al. Pancreatic stellate cells are an important source of MMP-2 in human pancreatic cancer and accelerate tumor progression in a murine xenograft model and CAM assay. *J Cell Sci* 2007;120(3):512-9.
108. Ruiter D, Borgenrieder T, Elder D, Herlyn M. Melanoma-stroma interactions: structural and functional aspects. *Lancet Oncol* 2002;3:35-43.
109. Ray JM, Stetler-Stevenson WG. Gelatinase A activity directly modulates melanoma cell adhesion and spreading. *EMBO J* 1995;14(5):908-17.
110. Peschos D, Damala C, Stefanou D, Tsanou E, Assimakopoulos D, Vougiouklakis T, et al. Expression of matrix metalloproteinase-9 (gelatinase B) in benign, premalignant and malignant laryngeal lesions. *Histol Histopathol* 2006;21(6):603-8.
111. Pei D, Kang T, Qi H. Cysteine array matrix metalloproteinase (CA-MMP)/MMP-23 is a type II transmembrane matrix metalloproteinase regulated by a single cleavage for both secretion and activation. *J Biol Chem* 2000;275(43): 33988-97.

112. Pantanowitz L, Dezube BJ, Hernandez-Barrantes S, Tahan SR, Dabbous MK. Matrix metalloproteinases in the progression and regression of Kaposi's sarcoma. *J Cutan Pathol* 2006;33(12):793-8.
113. Ou DP, Tao YM, Tang FQ, Yang LY. The hepatitis B virus X protein promotes hepatocellular carcinoma metastasis by upregulation of matrix metalloproteinases. *Int J Cancer* 2007;120(6):1208-14.
114. Okuducu AF, Zils U, Michaelis SA, Mawrin C, von Deimling A. Increased expression of avian erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1 in World Health Organization grade 1 meningiomas is associated with an elevated risk of recurrence and is correlated with the expression of its target genes matrix metalloproteinase-2 and MMP-9. *Cancer* 2006;107(6):1365-72.
115. Mylona E, Nomikos A, Magkou C, Kamberou M, Papassideri I, Keramopoulos A, et al. The clinicopathological and prognostic significance of membrane type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) and MMP-9 according to their localization in invasive breast carcinoma. *Histopathology* 2007;50(3):338-47.
116. Montgomery AM, Mueller BM, Reisfeld RA, Taylor SM, DeClerck YA. Effect of tissue inhibitor of the matrix metalloproteinases-2 expression on the growth and spontaneous metastasis of a human melanoma cell line. *Cancer Res* 1994;54(20):5467-73.
117. Mon NN, Hasegawa H, Thant AA, Huang P, Tanimura Y, Senga T. A role for focal adhesion kinase signaling in tumor necrosis factor-alpha-dependent matrix metalloproteinase-9 production in a cholangiocarcinoma cell line, CCKS1. *Cancer Res* 2006;66(13):6778-84.
118. Meyer E, Vollmer JY, Bovey R, Stamenkovic I: 4261–4272. Matrix metalloproteinases 9 and 10 inhibit protein kinase C potentiated, p53-mediated apoptosis. *Cancer Res* 2005;65:4261-72.

119. MacDougall JR, Bani MR, Lin Y, Muschel RJ, Kerbel RS. 'Proteolytic switching': opposite patterns of regulation of gelatinase B and its inhibitor TIMP-1 during human melanoma progression and consequences of gelatinase B overexpression. *Br J Cancer* 1999;80(3-4):504-12.
120. Liotta LA, Tryggvason K, Garbisa S, Hart I, Foltz CH, Shafie S. Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen. *Nature* 1980;284:67-8.
121. Kurschat P, Zigrino P, Nischt R, Breitkopf K, Steurer P, Klein CE, et al. 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* 1999;274(30):21056-62.
122. Kim HJ, Park CI, Park BW, Lee HD, Jung WH. Expression of MT-1 MMP, MMP2, MMP9 and TIMP2 mRNAs in ductal carcinoma in situ and invasive ductal carcinoma of the breast. *Yonsei Med J* 2006;47(3):333-42.
123. Kamat AA, Fletcher M, Gruman LM, Mueller P, Lopez A, Landen CN Jr. The clinical relevance of stromal matrix metalloproteinase expression in ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2006;12(6):1707-14.
124. Guzińska-Ustymowicz K. MMP-9 and cathepsin B expression in tumor budding as an indicator of a more aggressive phenotype of colorectal cancer (CRC). *Anticancer Research* 2006;26(2B):1589-94.
125. Jinga DC, Blidaru A, Condrea I, Ardeleanu C, Dragomir C, Szegli G, et al. MMP-9 and MMP-2 gelatinases and TIMP-1 and TIMP-2 inhibitors in breast cancer: correlations with prognostic factors. *J Cell Mol Med* 2006;10(2):499-510.
126. Jin JS, Hsieh DS, Lin YF, Wang JY, Sheu LF, Lee WH, et al. Increasing expression of extracellular matrix metalloprotease inducer in renal cell carcinoma: tissue microarray

analysis of immunostaining score with clinicopathological parameters. *Int J Urol* 2006;13(5):573-80.

127. Hussaini IM, Trotter C, Zhao Y, Abdel-Fattah R, Amos S, Xiao A, et al. Matrix metalloproteinase-9 is differentially expressed in nonfunctioning invasive and noninvasive pituitary adenomas and increases invasion in human pituitary adenoma cell line. *Am J Pathol* 2007;170(1):356-65.

128. Huang SC, Ho CT, Lin-Shiau SY, Lin JK. Carnosol inhibits the invasion of B16/F10 mouse melanoma cells by suppressing metalloproteinase-9 through down-regulating nuclear factor-kappa B and c-Jun. *Biochem Pharmacol* 2005;69(2):221-32.

129. Hood JD, Cheresch DA. Role of integrins in cell invasion and migration. *Nat Rev Cancer* 2002;2:91-100.

130. Hofmann UB, Westphal JR, Waas ET, Zendman AJ, Cornelissen IM, Ruiter DJ. Matrix metalloproteinases in human melanoma cell lines and xenografts: increased expression of activated matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) correlates with melanoma progression. *Br J Cancer* 1999;81(5):774-82.

131. Hofmann UB, Eggert AAO, Blass K, Bröcker EB, Becker JC. Stromal cells as the major source for matrix metalloproteinase-2 in cutaneous melanoma. *Arch Dermatol Res* 2005;297(4):154-60.

132. Graesslin O, Cortez A, Uzan C, Birembaut P, Quereux C, Darai E. Endometrial tumor invasiveness is related to metalloproteinase 2 and tissue inhibitor of metalloproteinase 2 expressions. *Int J Gynecol Cancer* 2006;16(5):1911-7.

133. Fujino H, Kondo K, Ishikura H, Maki H, Kinoshita H, Miyoshi T, et al. Matrix metalloproteinase inhibitor MMI-166 inhibits lymphogenous metastasis in an orthotopically implanted model of lung cancer. *Mol Cancer Ther* 2005;4(9):1409-16.

134. Di Carlo A, Terraccioano D, Mariano A, Macchia V. Urinary gelatinase activities (matrix metalloproteinases 2 and 9) in human bladder tumors. *Oncol Rep* 2006;15(5):1321-6.
135. Deryugina EL, Quigley JP. Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 2006;25:9-34.
136. Curran S, Murray GI. Matrix metalloproteinases in tumour invasion and metastasis. *J Pathol* 1999;189(3):300-8.
137. Coussens LM, Tinkle CL, Hanahan D, Werb Z. MMP-9 supplied by bone marrow-derived cells contributes to skin carcinogenesis. *Cell* 2000;103:481-90.
138. Chantrain CF, Henriet P, Jodele S, Emonard H, Feron O, Courtoy PJ, et al. Mechanisms of pericyte recruitment in tumour angiogenesis: a new role for metalloproteinases. *Eur J Cancer* 2006;42(3):310-8.
139. Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer* 2002;2(8):563-72.
140. Cardillo MR, Di Silveiro F, Gentile V. Quantitative immunohistochemical and in situ hybridization analysis of metalloproteinases in prostate cancer. *Anticancer Research* 2006;26(2A):973-82.
141. Campos RS, Lopes A, Guimaraes GC, Carvalho AL, Soares FA. E-cadherin, MMP-2, and MMP-9 as prognostic markers in penile cancer: analysis of 125 patients. *Urology* 2006;67(4):797-802.
142. Bugdayci G, Kaplan T, Sezer S, Turhan T, Koca Y, Kocer B, et al. Matrix metalloproteinase-9 in broncho-alveolar lavage fluid of patients with non-small cell lung cancer. *Exp Oncol* 2006;28(2):169-71.
143. Branca M, Ciotti M, Giorgi C, Santini D, Di Bonito L, Costa S, et al. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and its tissue inhibitor (TIMP-2) are prognostic factors in

cervical cancer, related to invasive disease but not to high-risk human papillomavirus (HPV) or virus persistence after treatment of CIN. *Anticancer Res* 2006;26(2B):1543-56.

144. Bindhu OS, Ramadas K, Sebastian P, Pillai MR. High expression levels of nuclear factor kappa B and gelatinases in the tumorigenesis of oral squamous cell carcinoma. *Head Neck* 2006;28(10):916-25.

145. Bergers G, Brekken R, McMahon G, Vu TH, Itoh T, Tamaki K, et al. Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat Cell Biol* 2000;2: 737-44.

146. Airola K, Karonen T, Vaalamo M, Lehti K, Lohi J, Kariniemi AL. Expression of collagenases-1 and -3 and their inhibitors TIMP-1 and -3 correlates with the level of invasion in malignant melanomas. *Br J Cancer* 1999;80(5-6):733-43.

147. Cardeal LBdS. Associação entre a alta expressão e atividade de metaloproteinasas e presença de HPV em linhagem de carcinomas cervicais humanos.[dissertação de mestrado]. São Paulo: Universidade de São Paulo. Faculdade de Ciências Farmacológicas, 2006.

148. Walker RA, Woolley DE. Immunolocalisation studies of matrix metalloproteinases-1, -2 e -3 in human melanoma. *Virchows Arch* 1999;435:574-9.

149. Bakos RM. Efeitos da Radiação Ultravioleta B na expressão imunoistoquímica das metaloproteinasas -2 e -9 em nevos melanocíticos.[dissertação de mestrado] Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina; 2005.

150. Iida J, Pei D, Kang T, et al. Melanoma Chondroitin Sulfate Proteoglycan Regulates Matrix Metalloproteinase - Dependent Human Melanoma Invasion into Type I Collagen. *J Biol Chem* 2001;276(22):18786-94.

151. Oltenfreiter R, Staelens L, Kersemans V, Cornelissen B, Frankenne F, Foidart JM, Van de Wiele C, et al. Valine-based biphenylsulphonamide matrix metalloproteinase inhibitors as tumor imaging agents. *Appl Radiat Isot* 2006;64(6):677-85.

152. Tas F, Yasasever V, Duranyildiz D, Camlica H, Ustuner Z, Aydiner A, et al. Clinical value of protein S100 and melanoma-inhibitory activity (MIA) in malignant melanoma. *Am J Clin Oncol* 2004;27(3):225-8.
153. Kayano K, Shimada T, Shinomiya T, Nakai S, Hisa Y, Aoki T, et al. Activation of pro-MMP-2 mediated by MT1-MMP in human salivary gland carcinomas: possible regulation of pro-MMP-2 activation by TIMP-2. *J Pathol* 2004;2002(4):403-11.
154. von Randow AJ, Schindler S, Tews DS. Expression of extracellular matrix-degrading proteins in classic, atypical, and anaplastic meningiomas. *Pathol Res Pract* 2006;202(5):365-72.
155. Petignat P, Laurine R, Goffin F, Bruchim I, Bischof P. Expression of matrix metalloproteinase-2 and mutant p53 is increased in hydatidiform mole as compared with normal placenta. *Int J Gynecol Cancer* 2006;16(4):1679-84.
156. Cavaleheiro BG. Expressão das metaloproteinases MMP-2, MT1-MMP e TIMP-2 e aspectos clinicopatológicos no carcinoma da glândula tireóide: implicações prognósticas. [Tese] São Paulo: Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. 2006.
157. Farnebo F, Svensson A, Thompson NW, Backdahl M, Grimelius L, Larsson C, et al. Expression of matrix metalloproteinase gelatinase A messenger ribonucleic acid in parathyroid carcinomas. *Surgery* 1999;126(6):1183-7.
158. Bovo AC, da Silva ID, Takita LC, Fochi J, Stavale JN, Marks G, et al. A comparative study of MMP-2 in vulvar neoplasms. *Gynecol Oncol* 2004;93(2):454-7.
159. Bjornland K, Flatmark K, Pettersen S, Aasen AO, Fodstad O, Maelandsmo GM. Matrix metalloproteinases participate in osteosarcoma invasion. *J Surg Res* 2005;127(2):151-6.

160. Pazzaglia L, Ponticelli F, Magagnoli G, Magagnoli G, Gamberi G, Ragazzini P, et al. Activation of metalloproteinases-2 and -9 by interleukin-1alpha in S100A4-positive liposarcoma cell line: correlation with cell invasiveness. *Anticancer Res* 2004;24(2B):967-72.
161. Ito H, Duybury M, Benoit E, Farivar RS, Gardner-Thorpe J, Zinner MJ, et al. Fibronectin-induced COX-2 mediates MMP-2 expression and invasiveness of rhabdomyosarcoma. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;318(2):594-600.
162. Sun BC, Sun Y, Zhao XL, Wang J, Wang X, Liu YX. Correlation between matrix metalloproteinases-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 expression, metastatic potential and tumor angiogenesis in synovial sarcoma and its prognostic significance. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi* 2006;35(3):155-8.
163. Berube M, Deschambeault A, Boucher M, Germain L, Petitclerc E, Guerin SL. MMP-2 expression in uveal melanoma: differential activation status dictated by the cellular environment. *Mol Vis* 2005;11:1101-11.
164. Melo FHM, Junqueira MS, Chammas R. Mecanismos de Invasão e Metástases. In: Brentani MM, Coelho FRG, Kowalski LP. Bases da Oncologia. 2ªed. São Paulo: Tecmedd; 2003 p.201-226.
165. Levin ER. Endothelins. *N Eng J Med* 1995. 333 (6): 356-63.
166. Bagnato A, Natali PG. Endothelin receptors as novel targets in tumor therapy. *J Transl Med.* 2004 27;2(1):16.
167. Goswami S, Sahai E, Wyckoff JB, Cammer M, Cox D, Pixley FJ, et al. Macrophages promote the invasion of breast carcinoma cells via a colony-stimulating factor-1/epidermal growth factor paracrine loop. *Cancer Res* 2005;65(5278–5283):5278-83.
168. Yamauchi K, Yang M, Jiang P, Yamamoto N, Xu M, Amoh Y, et al. Real-time in vivo dual-color imaging of intracapillary cancer cell and nucleus deformation and migration. *Cancer Res* 2005;65(10):4246-52.

169. Liotta LA, Kleinerman J, Saidel GM. Significance of Hematogenous Tumor-Cell Clumps in Metastatic Process. *Cancer Res* 1976;36:889-94.
170. Jurasz P, Alonso-Escolano D, Radomski MW. Platelet--cancer interactions: mechanisms and pharmacology of tumour cell-induced platelet aggregation. *Br J Pharmacol* 2004;143(7):819-26.
171. Levin VA, Phuphanich S, Young WK, Forsyth PA, Maestro RD, Perry JR, et al. Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of marimastat in glioblastoma multiforme patients following surgery and irradiation. *J Neurooncol* 2006;78(3):295-302.
172. Rosenbaum E, Zahurak M, Sinibaldi V, Carducci MA, Pili R, Laufer M, et al. Marimastat in the treatment of patients with biochemically relapsed prostate cancer: a prospective randomized, double-blind, phase I/II trial. *Clin Cancer Res* 2005;11(12):4437-43.
173. Sparano JA, Bernardo P, Stephenson P, Gradishar WJ, Ingle JN, Zucker S, et al. Randomized phase III trial of marimastat versus placebo in patients with metastatic breast cancer who have responding or stable disease after first-line chemotherapy: Eastern Cooperative Oncology Group trial E2196. *J Clin Oncol* 2004;22(23):4683-90.

## **11. ARTIGO EM PORTUGUÊS**

**A expressão imunoistoquímica da metaloproteinase da matriz 2 correlaciona-se com a progressão histológica do melanoma cutâneo primário em um estudo transversal de 55 casos**

**Autores:**

Eduardo Schenini Diehl, André Cartell, Jorge Fauri, Lucio Bakos, Maria Isabel Albano Edelweiss

Programa de Pós-Graduação Medicina: Ciências Médicas

Serviço de Dermatologia e Patologia – Hospital de Clínicas de Porto Alegre,

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil.

**Correspondência:** Eduardo Schenini Diehl – Rua Coronel Bordini 1252 / 501, CEP 90440-003, Porto Alegre, RS, Brasil. Telefone: (51)33212978, correio eletrônico: edudermatologista@yahoo.com.br.

## RESUMO

**Introdução:** O melanoma cutâneo é uma neoplasia com alto potencial metastático cuja incidência está em ascensão em vários países do mundo, incluindo o Brasil. Apesar de intensos estudos, muitos aspectos de seu comportamento biológico ainda são pouco compreendidos. A metaloproteinase da matriz 2 (MMP-2) e a metaloproteinase da matriz 9 (MMP-9) são enzimas que desempenham papel relevante na invasão e geração de metástases de diversos tipos de tumores - incluindo o melanoma - já que elas parecem estar envolvidas na degradação da lâmina basal, neo-angiogênese e controle da apoptose celular.

**Métodos:** Blocos de parafina com lesões de melanoma cutâneo primário foram cortados e processados pela técnica de imunoistoquímica com anticorpos anti-MMPs -2 e -9 e contracolorados com Giemsa. A expressão dessas metaloproteinases foi avaliada nas células endoteliais, estromais peritumorais e neoplásicas através de um escore qualitativo por dois observadores independentes e sem conhecimento dos dados clínicos. Uma média da expressão envolvendo esses locais também foi realizada. Os valores foram correlacionados ou associados com as seguintes variáveis demonstradas através de coloração por hematoxilina-eosina (H-E): subtipo histológico, espessura de Breslow, nível de Clark, presença de ulceração microscópica, área de regressão, presença de infiltrado inflamatório e índice mitótico.

Os dados foram analisados com o programa SPSS versão 12<sup>®</sup> segundo o coeficiente de correlação gamma de Goodman-Kruskal (coeficiente  $G_{[G-K]}$ ) e Teste Exato de Fisher.

**Resultados:** A média da expressão da MMP-2 do tumor, endotélio e estroma peritumoral correlacionou-se de forma estatisticamente significativa com o nível de Clark, espessura de Breslow e índice mitótico ( $p=0,006$ ,  $p=0,001$  e  $p=0,004$ , respectivamente). Tal média foi maior nos pacientes do sexo feminino ( $p=0,01$ ). Lesões ulceradas apresentaram uma expressão maior de MMP-2 ( $p=0,034$ ).

Não houve relação entre a média da expressão da MMP-9 com nenhuma variável. No entanto, a MMP-9 intratumoral correlacionou-se de forma forte e significativa com o Breslow ( $G_{[G-K]}= 0,67$ ;  $p=0,001$ ). Não houve relação entre as demais variáveis estudadas e a MMP-9.

**Conclusões:** Na amostra estudada, a progressão do melanoma cutâneo primário medida através das variáveis histológicas convencionais (espessura de Breslow, nível de Clark e índice mitótico) acompanhou-se de concomitante aumento da média (tumor/estroma/endotélio) da expressão imunohistoquímica da MMP-2, o mesmo não ocorrendo com a MMP-9.

**Descritores/unitermos:** melanoma; MMP-2; MMP-9; imunohistoquímica; variáveis histopatológicas.

## INTRODUÇÃO

As metaloproteinases da matriz (MMPs) são uma ampla família de enzimas cuja atividade catalítica depende de um íon de metal – usualmente o zinco - e que são capazes de degradar diferentes componentes da matriz extra-celular (1, 2).

Embora apresentem ampla gama de funções fisiológicas (reparo tecidual, regeneração óssea e outras), grande interesse recai sobre seu potencial, livre de mecanismos regulatórios, na propagação do câncer (3).

A invasão neoplásica compreende múltiplos passos. As MMPs, através da degradação da matriz extracelular e da membrana basal, podem auxiliar na proliferação das células tumorais e disseminação metastática. Além disso, podem ter papel relevante na neo-angiogênese e controle da apoptose (3).

Dentre as 23 MMPs humanas já descritas, as gelatinases (MMP-2 e -9), a MMP-1 e seus inibidores teciduais (TIMPs) são as que, aparentemente, desempenham papel mais importante na progressão tumoral do melanoma (2, 4).

Foi demonstrada uma correlação entre alta expressão imunoistoquímica de MMP-2 e baixa sobrevida, de forma que a MMP-2 foi considerada fator prognóstico independente das variáveis histológicas mais utilizadas (5). Entretanto, estudo recente utilizando técnica de reação em cadeia pela polimerase não demonstrou haver associação positiva entre a expressão gênica da MMP-2 e o risco de metástases linfonodais (6).

A maior parte dos estudos envolvendo MMPs em melanoma (e no câncer em geral) ocorre *in vitro* principalmente através de cultura de células neoplásicas ou *in vivo* em modelo animal (habitualmente camundongos) (3, 4). Tendo em vista a importância da interação do estroma peritumoral com as células neoplásicas na progressão do melanoma (7), incluindo o fato de que a maior parte da MMP-2 parece ser produzida pelo tecido não tumoral (8), são necessários mais estudos *in vivo* em lesões de melanoma cutâneo

relacionando a expressão das MMPs com os achados histológicos convencionais que caracterizam a progressão da doença (9).

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Amostra**

Estudo transversal utilizando blocos histológicos de 55 pacientes consecutivos com diagnóstico de melanoma primário, entre o período de janeiro de 2004 e janeiro de 2006 selecionados dos arquivos de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) –, região sul do Brasil. Foram excluídos do estudo pacientes com os seguintes achados: lesão em mucosa, lesões recidivadas; metástases de melanoma e biópsias incisionais ou com material insuficiente para adequado estadiamento microscópico. As variáveis clínicas foram obtidas através de busca ao prontuário.

O projeto recebeu aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA.

### **Imunoistoquímica**

Os blocos de parafina correspondentes às lesões primárias foram cortados a uma espessura de 3  $\mu$ m e processados no Centro de Pesquisa Experimental do HCPA com anticorpo anti-MMP-2 humano clone 17B11 (Novocastra®, Inglaterra), classe IgG2a kappa e anti-MMP-9 humano clone 15W2 classe IgG2 kappa (Novocastra®, Inglaterra), em diluição de 1:40 através de metodologia de imunoistoquímica já desenvolvida para essa linha de pesquisa (Tese de Doutorado de Renan Rangel Bonamigo (10) e Dissertação de Mestrado de Renato Bakos(11)). A técnica de imunoistoquímica foi contraindicada com Giemsa, conforme descrito por Sálvio *et al.* (12).

Os controles positivos da MMP-2 e da MMP-9 foram realizados, respectivamente, em lâminas de cólon inflamado e fígado. Para os controles negativos foram testadas lâminas sem o anticorpo primário. Tanto os controles positivos quanto os negativos foram previamente testados e usados concomitantemente a cada 20 lâminas.

### **Variáveis**

Para a avaliação da expressão das MMPs -2 e -9 foi utilizado um escore qualitativo ordinal já testado em nevos melanocíticos (11): 0+ sem expressão; 1+ expressão fraca; 2+ expressão moderada e 3+ expressão forte. As lâminas histológicas coradas por técnica de imunistoquímica foram examinadas de forma independente e cega quanto ao laudo histopatológico e a coloração H-E correspondente por dois patologistas. Posteriormente, os dados foram cruzados com o laudo histopatológico e, nos casos de dados incompletos, as lâminas coradas com H-E foram reexaminadas.

O local de maior expressão das MMPs -2 e -9 dentro do tumor, no tecido estromal peritumoral e no endotélio peritumoral bem como uma média da expressão das localizações citadas foi correlacionada com as seguintes variáveis: sexo, subtipo histológico (melanoma de espalhamento superficial, lentigo maligno, lentigo maligno melanoma, melanoma nodular, melanoma lentiginoso acral e melanoma spitzóide); espessura de Breslow em milímetros (1 até 1,00mm ( ou *in situ* ); 2 entre 1,01 até 2,00mm; 3 de 2,01 até 4,00mm e 4 mais de 4,00 mm); nível de invasão de Clark (I se restrito a epiderme, II se invadir derme papilar; III se preencher toda a derme papilar; IV se penetrar na derme reticular e V se invadir tecido celular subcutâneo); presença de infiltrado inflamatório peri ou intratumoral (discreto ou ausente *versus* moderado a intenso); índice mitótico ( número de mitoses por mm<sup>2</sup>); ulceração acima de 3 mm e presença ou ausência de áreas de regressão histológica.

## **Análise Estatística**

A análise estatística foi realizada com o programa SPSS versão 12 para Windows®. Para assegurar homogeneidade interobservador foi utilizado o coeficiente Kappa e um bom nível de concordância foi atribuído para Kappa > 0,6 (p<0,05).

A medida de correlação entre a expressão das metaloproteinases e demais variáveis qualitativas ordinais (espessura de Breslow, nível de Clark e índice mitótico) foi analisada segundo o coeficiente de correlação gamma de Goodman-Kruskal (coeficiente  $G_{[G-K]}$ ) sendo considerada estatisticamente significativa quando p<0,05. O coeficiente gamma de Goodman-Kruskal (coeficiente  $G_{[G-k]}$ ) é simétrico e seu módulo varia entre zero (nenhuma associação) a 1 (associação perfeita) (13).

As demais associações foram realizadas através do Teste Exato de Fisher e consideradas sendo estatisticamente significativa quando p< 0,05.

## **RESULTADOS**

A amostra estudada foi constituída por lâminas histológicas de 55 pacientes caucasianos com idade entre 32 e 72 anos sendo 30 homens (54,5% dos casos), 25 mulheres (45,5%). O melanoma de espalhamento superficial foi o mais freqüente (47,3%), seguido pelo melanoma nodular (14,5%), lentigo maligno (12,7%), lentigo maligno melanoma (10,9%), melanoma spitzóide e não classificáveis (9,1%) e melanoma lentiginoso acral (5,4%). A tabela I indica a freqüência dos subtipos histológicos encontrados e sua relação com o sexo dos pacientes. A espessura das lesões está representada na tabela II. Há distribuição bimodal, sendo que predominavam lesões finas (Breslow até 1 mm ou *in situ*) e, de forma não tão importante, lesões avançadas.

**Tabela I: Freqüência dos subtipos histológicos encontrados e sua relação com o sexo em 55 casos de melanoma.**

<b>Subtipo</b>	<b>Masculino</b>	<b>Feminino</b>	<b>Total</b>
MES	11 (20,0%)	15 (27,3%)	26 (47,3%)
MN	5 (9,1%)	3 (5,4%)	8 (14,5%)
LM	3 (5,4%)	4 (7,3%)	7 (12,7%)
LMM	6 (10,9%)	0 (0,0%)	6 (10,9%)
MLA	3 (5,4%)	0 (0,0%)	3 (5,4%)
MNC	2 (3,6%)	3 (5,4%)	5 (9,1%)
<b>Total</b>	<b>30 ( 54,5%)</b>	<b>25 (45,5%)</b>	<b>55 (100%)</b>

**Legenda:** MES= melanoma de espalhamento superficial; MN = melanoma nodular; LM = lentigo maligno; LMM = lentigo maligno melanoma; MLA = melanoma lentiginoso acral; MNC = melanoma não classificável/spitzóide.

**Tabela II: Freqüência da espessura tumoral em 55 casos de melanoma**

<b>Breslow</b>	<b>Freqüência</b>	<b>%</b>	<b>% cumulativa</b>
Até 1 mm (ou <i>in situ</i> )	29	52,7	52,7
de 1,01 a 2,00mm	5	9,1	61,8
de 2,01 a 4,00mm	4	7,3	69,1
acima de 4,00mm	17	30,9	100,0
Total	55	100,0	-

A maior parte das lesões penetrava no derma reticular sem atingir o tecido celular subcutâneo (Clark IV), conforme mostra tabela III.

**Tabela III: Frequência de nível de invasão Clark em 55 casos de melanoma**

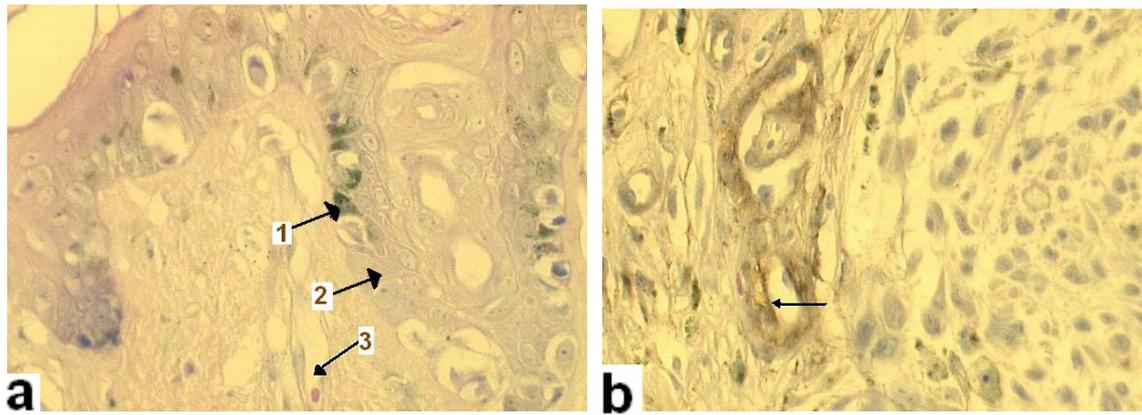
<b>Nível de Clark</b>	<b>Frequência</b>	<b>%</b>	<b>% cumulativa</b>
I	9	16,4	14,5
II	9	16,4	32,7
III	7	12,7	45,5
IV	21	38,2	83,6
V	8	14,5	98,2
Não especificado	1	1,8	100,0
Total	55	100,0	

Em 38,2% das lesões havia ulceração acima de 3 mm. A presença de ulceração foi muito mais freqüente no melanoma nodular e no melanoma lentiginoso acral que nos outros subtipos ( $p < 0,01$ ).

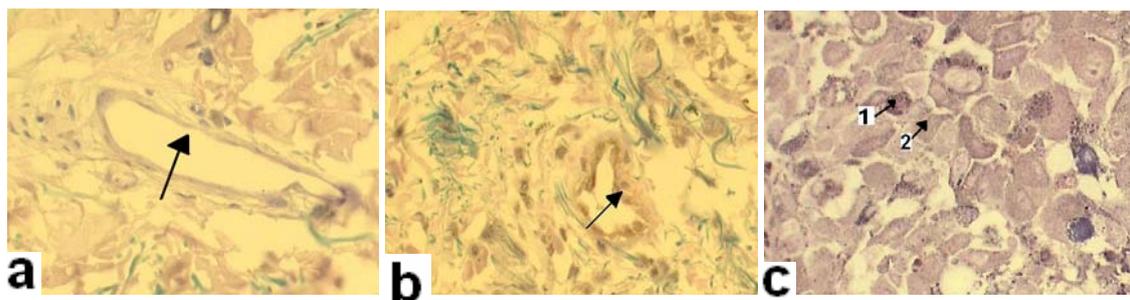
Em 27,3% dos casos havia regressão histológica. Esta predominou no lentigo maligno e no lentigo maligno melanoma e, de forma menos intensa, no melanoma de espalhamento superficial.

Em 30,9% dos casos avaliados quanto à presença de infiltrado inflamatório, este era moderado a intenso. O infiltrado predominou nos lentigos malignos e no melanoma de espalhamento superficial.

As MMPs -2 e -9 foram avaliadas no endotélio peritumoral, células neoplásicas e células estromais (figuras I e II).



**Figuras Ia-b Expressão imunoistoquímica da MMP -2.** Coloração pelo Giemsa. Aumento original: 40X **a:** Coloração esverdeada em algumas células (seta 1) não representa MMP, mas sim, grânulos de melanina corados pelo Giemsa. Ausência de expressão nas células neoplásicas (seta 2) e endotélio (seta 3). **b:** Células endoteliais intensamente coradas (seta).



**Figuras IIa-c Expressão imunoistoquímica da MMP-9.** Coloração pelo Giemsa. Aumento original: 40X (50X na figura c) **a** Células endoteliais sem expressão (seta). **b** Endotélio com expressão forte (seta). **c** células neoplásicas com alta expressão (seta 2). Setas 1 demonstra grânulos de pigmento melânico.

Não houve associação estatisticamente significativa entre a média da expressão das MMPs-2 e -9 no endotélio, tumor e estroma, com o grau de infiltrado inflamatório ( $p=0,38$  e  $p=0,56$ , respectivamente) bem como com a presença de áreas de regressão histológica ( $p=0,22$  e  $p=0,69$ , respectivamente). Quanto à expressão dessas enzimas especificamente no endotélio, nas células neoplásicas e no estroma peritumoral, em relação à presença de infiltrado inflamatório e áreas de regressão, novamente não existiu associação relevante

( $p > 0,05$ ). Não houve também associação entre a média da expressão da MMP-9 e a presença de ulceração ( $p = 0,43$ ) bem como o sexo do indivíduo ( $p = 0,91$ ). O mesmo ocorreu no que tange a sua expressão especificamente no endotélio, estroma e melanócitos neoplásicos em relação ao sexo e presença de ulceração ( $p > 0,05$  em todos os casos).

A expressão imunoistoquímica das MMPs -2 e -9 nas diversas estruturas estudadas em relação ao nível de Clark e espessura de Breslow foi analisada segundo o coeficiente de correlação gamma de Goodman-Kruskal (coeficiente  $G_{[G-k]}$ ) e demonstrado abaixo (tabela III). O módulo de correlação segue a seguinte escala: 0 (nenhuma); até 0,1 (trivial); até 0,3 (fraca); até 0,5 (moderada); até 0,7 (forte); até 0,9 (muito forte); acima de 0,9 (quase perfeita) e 1 (perfeita).

**Tabela IV: Correlação entre a expressão imunoistoquímica das MMPs -2 e -9 na neoplasia, endotélio e região peritumoral, bem como a média dessas regiões, com a espessura de Breslow e o nível de Clark**

	MMP-2		MMP-9	
	Breslow	Clark	Breslow	Clark
<b>Neoplasia</b>	0,31 (0,04)	0,20 (0,19)	0,67 (<0,01)	0,21(0,27)
<b>Endotélio</b>	0,36 (0,05)	0,32 ( 0,05)	0,15 ( 0,42)	0,13 (0,45)
<b>Peritumor</b>	0,57 (<0,01)	0,52 (<0,01)	0,22 (0,26)	0,28 ( 0,07)
<b>Total</b>	0,52 (<0,01) <sup>1</sup>	0,45 (<0,01) <sup>2</sup>	0,28 (0,20) <sup>3</sup>	0,20 (0,29) <sup>4</sup>

$G_{[G-k]}$  (valor p)

<sup>1</sup>Média entre a expressão da MMP-2 no endotélio, células neoplásicas e estroma e o Breslow

<sup>2</sup>Média entre a expressão da MMP-2 no endotélio, células neoplásicas e estroma e o Clark

<sup>3</sup> Média entre a expressão da MMP-9 no endotélio, células neoplásicas e estroma e o Breslow

<sup>4</sup> Média entre a expressão da MMP-9 no endotélio, células neoplásicas e estroma e o Clark

Houve uma correlação fraca, não estatisticamente significativa, entre a média da expressão das MMP-9 no tumor, endotélio e tecido peritumoral e o nível de invasão de Clark e espessura de Breslow ( $p=0,29$  e  $0,20$ , respectivamente) (tabela IV; figuras III e VI). Houve uma relação positiva forte e estatisticamente significativa entre a expressão da MMP-9 intratumoral e o Breslow ( $G_{[G-k]}=0,67$  e  $p=0,001$ ) (tabela IV).

Para a configuração dos gráficos e melhor compreensão didática, (figuras III, IV, V e VI) os valores médios foram categorizados conforme se segue: até 1,00: +; acima de 1,00 até 2,00: ++ e acima de 2,00 até 3,00: +++.

O índice mitótico correlacionou-se de forma moderada e estatisticamente significativa com a expressão média da MMP-2 ( $G_{[G-K]}=0,51$  e  $p=0,004$ ). A maior relação foi com o estroma peritumoral ( $G_{[G-K]}=0,52$  e  $p=0,002$ ) e, de forma não tão intensa, com o endotélio ( $G_{[G-K]}=0,39$  e  $p=0,02$ ). Não houve correlação entre o índice mitótico e a média da expressão da MMP-9 ( $p=0,58$ ), MMP-9 intratumoral ( $p=0,27$ ), MMP-9 no endotélio ( $p=0,42$ ) e no estroma ( $p=0,13$ ).

Lesões ulceradas apresentaram maior expressão média de MMP-2 ( $p=0,034$ ), mais especificamente no estroma ( $p=0,013$ ). Nas outras áreas estudadas tal associação não existiu ( $p>0,05$ ).

A expressão média da MMP-2 foi mais intensa em indivíduos do sexo feminino ( $p=0,01$ ). O mesmo não ocorreu com a MMP-9 ( $p=0,91$ ).

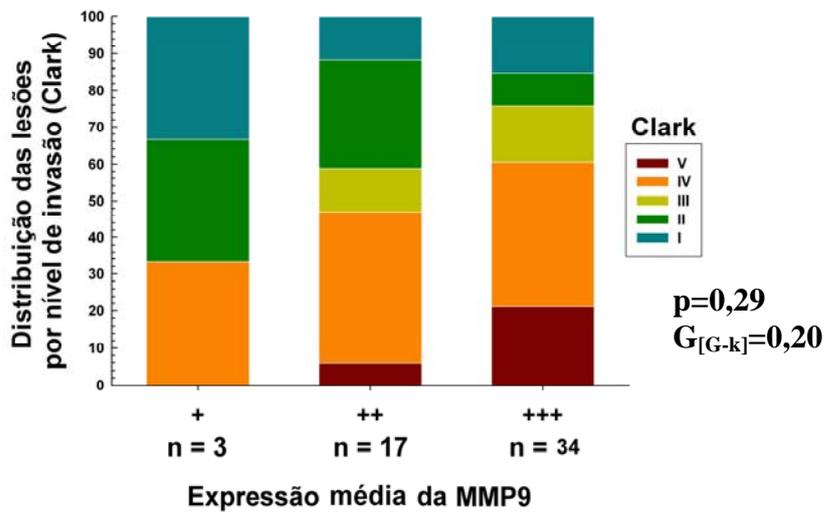


Figura III: A expressão imunoistoquímica da MMP-9 em 54 casos de melanoma conforme o nível de Clark

OBS: Em 1 caso o Clark não pode ser especificado.

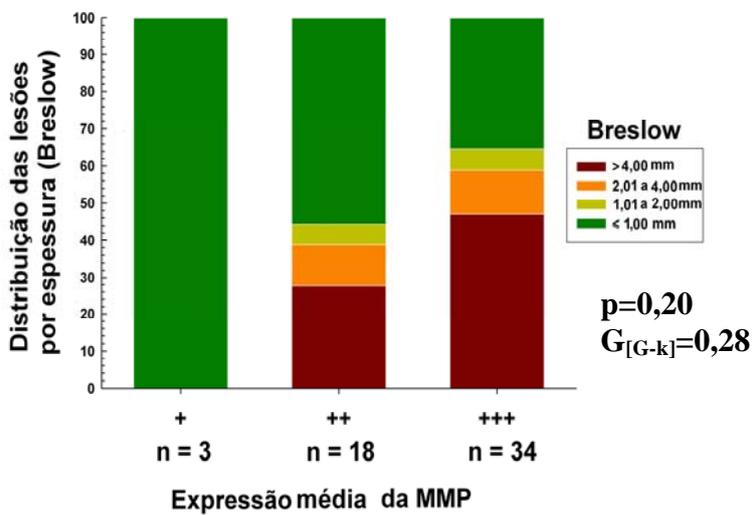
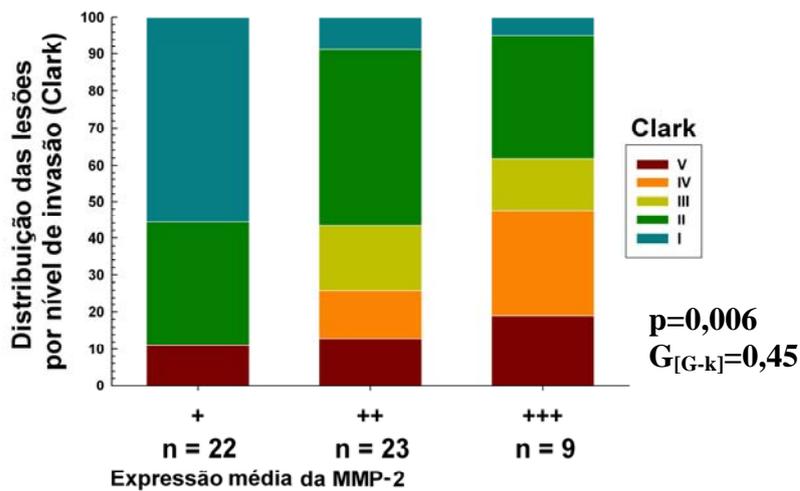


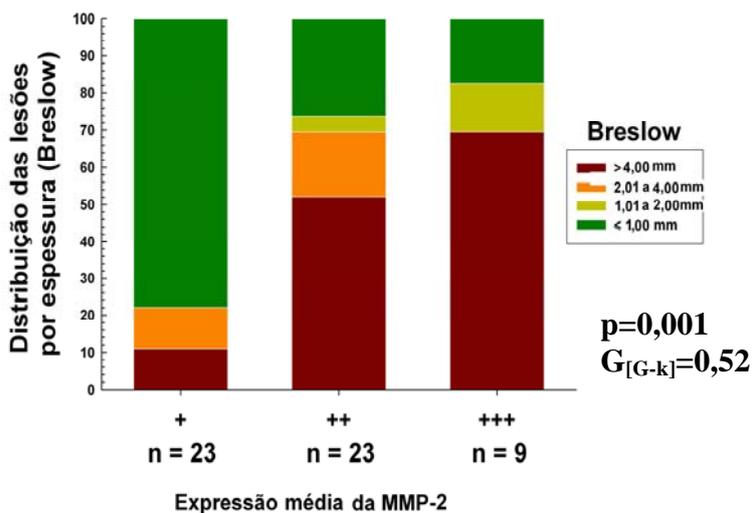
Figura IV: A expressão imunoistoquímica da MMP-9 em 55 casos de melanoma conforme espessura de Breslow

A expressão média da MMP-2 correlacionou-se de forma estatisticamente significativa com o nível de Clark e a espessura de Breslow ( $p=0,006$  e  $p=0,001$ , respectivamente) ( tabela IV; figuras V e VI)



**Figura V:** A expressão imunohistoquímica da MMP-2 em 54 casos de melanoma conforme nível de Clark

OBS: Em um caso o Clark não pode ser especificado



**Figura VI:** A expressão imunohistoquímica da MMP-2 em 55 casos de melanoma conforme espessura de Breslow

## DISCUSSÃO

O melanoma é uma neoplasia grave com alta capacidade de gerar metástases e com prognóstico sombrio nos estágios mais avançados (14).

Desde os trabalhos iniciais correlacionando o potencial da neoplasia de produzir metástases com a degradação enzimática da membrana basal há quase três décadas (15), tem havido interesse crescente no estudo destas enzimas e suas interações com as células neoplásicas assim como o estroma (3).

Há evidências de que as MMPs -2 e -9 sejam importantes na sua progressão, mas ainda há questões a serem melhor esclarecidas, principalmente pela falta de trabalhos *in vivo* em lesões em humanos (16).

A contracoloração habitual da imunoistoquímica com hematoxilina-eosina pode ser problemática em lesões altamente pigmentadas, ricas em melanina. Nessas situações, pigmento marrom formado pelo cromógeno DAB pode não ser facilmente diferenciado dos grânulos marrons do pigmento de melanina. A coloração de Giemsa foi usada com sucesso para diferenciar as células neoplásicas de melanófagos em melanomas finos com infiltrado inflamatório ativo por Sálvio *et al.* Com essa técnica, o pigmento de melanina foi corado de azul esverdeado contrastando com a coloração positiva pelo Melan-A dos melanócitos, que permaneceu marrom. Macrófagos negativos para Melan-A continham apenas grânulos grosseiros azul-esverdeados no citoplasma (12). Utilizamos também o Giemsa como contracorante para MMP-2 e -9 com bons resultados (figuras I e II).

A MMP-2 é secretada em sua forma inativa (pró-MMP-2) e ativada através da ligação com um complexo envolvendo um inibidor da metaloproteinase (TIMP) em baixa concentração associado com uma metaloproteinase de membrana (MT-MMP) (1, 16).

Embora a técnica de imunoistoquímica não permita identificar a forma ativa da enzima, Ohnishi *et al.* observaram uma constante co-localização envolvendo a MMP-2 com

as MT2-MMP e MT3-MMP nos melanomas. Dessa forma, a MMP-2, quando presente no melanoma, provavelmente encontra-se na forma ativa (17).

Apesar da medida da expressão da metaloproteinase por meio de imunohistoquímica ser um método um tanto subjetivo houve um índice Kappa interobservador aceitável ( $p < 0,05$ ) em todas as variáveis.

Väisänen *et al.* (5) demonstraram que a expressão imunohistoquímica da MMP-2 representaria um fator prognóstico independente dos demais parâmetros histológicos para o melanoma cutâneo primário. Além disso, indivíduos do sexo masculino expressaram mais a enzima, o que poderia ser uma justificativa para o fato de o sexo masculino ser considerado fator de pior prognóstico em alguns estudos prévios (5). No presente estudo, a média da expressão (tumor/endotélio/estroma) da MMP-2 foi maior em mulheres.

O nível de invasão de Clark e, sobretudo, a espessura tumoral (Breslow) correlacionaram-se de forma estatisticamente significativa com a expressão média da MMP-2 (neoplasia/endotélio/tumor). A relação mais forte foi com a matriz extracelular peritumoral tanto no Clark quanto no Breslow. Os achados confirmam os dos estudos *in vivo* e *in vitro* de Hofmann *et al.* em que havia uma relação direta entre a progressão da lesão melanocítica e a expressão da MMP-2. Nesses estudos, houve ainda uma co-localização da MMP-2 com a metaloproteinase de membrana 1 (MT1-MMP), indicando que provavelmente se trata da forma ativa da enzima (18).

Ainda que van den Oord *et al.* tenham referido que a expressão imunohistoquímica da MMP-9 estaria mais associada a lesões iniciais (fase de crescimento horizontal) com uma perda progressiva à medida que o melanoma avança (19), nosso trabalho mostrou não haver associação significativa (positiva ou negativa) entre a expressão média da MMP-9 e a progressão do melanoma. Curiosamente, nas células neoplásicas intratumorais, a associação em relação à espessura de Breslow existiu.

A ulceração não traumática acima de 3 milímetros de diâmetro representa um fator prognóstico do melanoma tendo sido inclusive incorporado nos atuais protocolos de estadiamento (20). Seu mecanismo pode estar relacionado com uma diminuição do suprimento sanguíneo pela rápida expansão tumoral na derme o que explicaria sua maior frequência em melanoma de crescimento rápido como o nodular (21). Neste trabalho, os oito melanomas nodulares e os três lentiginosos acrais eram ulcerados. Outras explicações para o fenômeno são a fragilidade e conseqüente ruptura da epiderme devido a sua infiltração por células neoplásicas (21). É possível que as metaloproteinases estejam envolvidas nesse processo ainda que não haja estudos específicos sobre o tema (16). Encontramos nas lesões com alta expressão média de MMP-2 uma frequência maior de ulceração do que nas lesões com menor expressão. O mesmo não ocorreu com a MMP-9.

O melanoma freqüentemente apresenta áreas de regressão histológica, sobretudo nas lesões finas. Ainda que o papel da regressão histológica parcial no prognóstico desta neoplasia ainda seja controverso, acredita-se que muitos casos de melanoma metastático com tumor primário desconhecido possam ser explicados por uma regressão total do tumor primário (21). Estudo com cultura de células de melanoma realizado em modelo murino indica que a principal fonte de MMP-2 durante a progressão do melanoma são os fibroblastos (8). Mesmo que possivelmente estas células, juntamente com os linfócitos, desempenhem papel relevante na regressão do melanoma (21), não houve associação estatisticamente significativa entre a expressão das MMPs -2 e -9 e a presença de regressão histológica no presente estudo.

A presença de infiltrado inflamatório linfocítico pode ou não ser seguida posteriormente de áreas de regressão (21). Há estudos indicando que a presença de acentuado infiltrado intratumoral seria um critério de bom prognóstico (22).

Em modelo carcinogênico cutâneo, a fonte celular fornecedora de MMP-9 são as células inflamatórias incluindo neutrófilos, macrófagos e mastócitos originados da medula óssea (23). Não houve relação entre a presença de infiltrado inflamatório peri ou intratumoral e a expressão das MMPs no nosso estudo.

O índice mitótico, usualmente expresso em numero de mitoses em 10 campos de grande aumento, foi sugerido como importante fator prognóstico em estudo envolvendo 3661 pacientes australianos (24). Pacientes apresentando índice mitótico muito baixo (menos de uma mitose em 10 campos de grande aumento) apresentavam uma expressão média de MMP-2 inferior aos outros. No entanto, não houve uma associação estatisticamente significativa entre os outros grupos.

Os resultados deste trabalho corroboram com os de estudos prévios indicando que possivelmente haja uma associação entre a expressão imunoistoquímica da MMP-2 e, de forma bem menos intensa, da MMP-9 e a progressão do melanoma cutâneo.

### **Agradecimentos**

À Neiva Copetti pelo auxílio na execução da técnica de imunoistoquímica e ao Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE- Hospital de Clínicas de Porto Alegre) pelo auxílio financeiro.

### **REFERÊNCIAS:**

1. Woessner JF, Nagase H. Matrix Metalloproteinases and TIMPs. 1 ed: Oxford University Press; 2002.
2. Visse R, Nagasi H. Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases: Structure, Function, and Biochemistry. *Circ Res* 2003;92:827-39.
3. Deryugina EL, Quigley JP. Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 2006;25:9-34.

4. Hofmann UB Westphal JR, van Muijen GNP, Ruiter DJ. Matrix Metalloproteinases in Human Melanoma. *J Invest Dermatol* 2000;115(3):337-44.
5. Väisänen A Kallioinen M, Taskinen PJ, Turpeenniemi-Hujanen T. Prognostic value of MMP-2 immunoreactive protein (72 kD type IV collagenase) in primary skin melanoma. *J Pathol* 1998; 186. (1):51-8.
6. Otto K, Starz H, Becker JC, Schrama D. Overexpression of Matrix Metalloproteinases, Chemokines, and Chemokine Receptors Relevant for Metastasis in Experimental Models Not an Indication of Lymph Node Metastases in Human Melanoma. *Arch Dermatol* 2007;143(7):947-8.
7. Ruiter D, Borgenrieder T, Elder D, Herlyn M. Melanoma-stroma interactions: structural and functional aspects. *Lancet Oncol* 2002;3:35-43.
8. Hofmann UB, Eggert AAO, Blass K, Bröcker EB, Becker JC. Stromal cells as the major source for matrix metalloproteinase-2 in cutaneous melanoma. *Arch Dermatol Res* 2005;297(4):154-60.
9. Walker RA, Woolley DE. Immunolocalisation studies of matrix metalloproteinases-1, -2 e -3 in human melanoma. *Virchows Arch* 1999;435:574-9.
10. Bonamigo RR. A expressão imunoistoquímica das metaloproteinases-2 e -9 da Matriz na rosácea inflamatória.[Tese] Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2003.
11. Bakos RM. Efeitos da Radiação Ultravioleta B na expressão imunoistoquímica das metaloproteinases -2 e -9 em nevos melanocíticos. [dissertação de mestrado] Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2005.
12. Salvio AG, Marques MEA. Imuno-histoquímica para identificação de células neoplásicas no infiltrado ativo de melanomas finos. *J Bras Patol Med Lab* 2006;42(2):143-8.
13. Goodman LA, Kruskal WH. Measures of association for cross classifications. *J Am Stat Assoc* 1994; 49: 732-64.
14. Miller JA, Mihm Jr. MC. Melanoma. *N Eng J Med* 2006;355(1):51-65.
15. Liotta LA, Tryggvason K, Houben R, Garbisa S, Hart I, Foltz CH, Shafie S. Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen. *Nature* 1980;284:67-8.
16. Hofmann UB, Houben R, Bröcker EB, Becker JC. Role of matrix metalloproteinases in melanoma cell invasion. *Biochimie* 2005;87:307-14.

17. Ohnishi Y, Tajima S, Ishibaschi A. 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* 2001;11(5):420-3.
18. Hofmann UB, Westphal JR, Zendman AJ, Becker JC, Ruiter DJ, van Muijen GNP. Expression and Activation of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and its co-localization with membrane-type matrix metalloproteinase 1 (MT1-MMP) correlate with melanoma progression. *J Pathol* 2000;191:245-56.
19. Van den Oord JJ, Peaman L, Opdenakker G, de Wolf Peeters C. Expression of gelatinase B and the extracellular matrix metalloproteinase inducer EMPRIN in benign and malignant pigment cell lesions of the skin. *Am J Pathol* 1997;151:665-70.
20. Balch CM, Buzaid AC, Soong SJ, Atkins MB, Cascinelli N, Coit DG, et al. Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. *J Clin Oncol* 2001;19 (16):3635-48.
21. Barnhill RL. Pathology of Malignant Melanoma. 1 ed. New York: Springer; 2004.
22. Clemente CG, Mihm MC Jr, Bufalino R, Zurrida S, Collini P, Cascinelli N. Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma. *Cancer* 1996;77(7):1303-10.
23. Coussens LM, Tinkle CL, Hanahan D, Werb Z. MMP-9 supplied by bone marrow-derived cells contributes to skin carcinogenesis. *Cell* 2000;103:481-90.
24. Azzola MF, Shaw HM, Thompson JF, Soong SJ, Scolyer RA, Watson GF, et al. Tumor mitotic rate is a more powerful prognostic indicator than ulceration in patients with primary cutaneous melanoma: an analysis of 3661 patients from a single center. *Cancer* 2003;97(6):1488-98.

## 12. ARTIGO EM INGLÊS

**Immunohistochemical expression of matrix metalloproteinase 2 was positively correlated with histological cutaneous melanoma progression in a transversal study of 55 cases**

**Authors:**

Eduardo Schenini Diehl, André Cartell, Jorge Fauri, Lucio Bakos, Maria Isabel Albano Edelweiss

Programa de Pós-Graduação Medicina: Ciências Médicas

Department of Dermatology and Department of Pathology – Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil.

**Correspondence:** Eduardo Schenini Diehl – Coronel Bordini St. 1252 / 501, CEP 90440-003, Porto Alegre, RS, Brazil. Phone: +55 51 33212978, e-mail: edudermatologista@yahoo.com.br

## ABSTRACT

**Background:** Cutaneous melanoma is notorious for its tendency to give rise to metastases. Its incidence is rising in several countries including Brazil. In spite of extensive research, much of its biological behavior is still poorly understood. Matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) and matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) play an important role in tumor invasion and metastasis in many types of tumors – including melanoma- since they are critical factors not only for basement membrane degradation but also for tumor angiogenesis and cellular apoptosis control.

**Methods:** Paraffin-embedded specimens of primary cutaneous melanoma were cut and stained with antibodies anti – MMPs -2 and -9 and counterstained with Giemsa. The expression of these metalloproteinases was assessed in neoplastic, endothelial and in peritumoral stromal cells with a qualitative scoring by two independent assessors without knowledge about clinical data. An average expression of all these sites was also performed. The data were correlated or associated with the following variables assessed with the habitual staining (hematoxylin-eosin): sex; histological subtype Breslow's thickness; Clark's level; the appearance of microscopic ulceration, regression, inflammatory infiltrate; and mitotic index. The data were analyzed using the programme SPSS version 12. Goodman Kruskal gamma correlation coefficient ( $G_{[G-K]}$ ) and Fisher's Exact Test were used and considered statistically significant when  $p < 0.05$ .

**Results:** The average MMP-2 expression in the tumor, endothelium and stromal cells was statistically significant correlated with Clark level, Breslow thickness and mitotic rate ( $p=0.006$ ,  $p=0.001$  and  $p=0.004$ , respectively). Also, women showed a higher average MMP-2 expression than men ( $p=0.01$ ). Ulcerative lesions exhibited a stronger expression of MMP-2 ( $p=0.034$ ).

There were no statistically significant differences between the average expression of MMP-9 and any variables. However, intratumoral MMP-9 was strongly and statistically significant correlated with Breslow ( $G_{[G-K]} = 0.67$ ,  $p = 0.001$ ). There were no relations among the other variables analyzed.

**Conclusions:** In the studied sample, the progression of primary cutaneous melanoma gauged by conventional histological variables (Breslow thickness, Clark level and mitotic rate) showed a concomitant increase in the mean immunohistochemical expression of MMP-2 (tumor/stroma/endothelium), but this was not observed for MMP-9.

**Keywords:** melanoma; MMP-2; MMP-9, immunohistochemistry, histopathological variables

## INTRODUCTION

Matrix metalloproteinases (MMPs) constitute a large family of enzymes whose catalytic activity depends on a metal ion – usually zinc – and are capable of degrading many extracellular matrix (ECM) components (1,2).

In spite of having a huge range of physiological functions (tissue repair, bone regeneration, and others), great interest is placed upon in its potential, without regulatory mechanisms, for cancer dissemination (3).

Tumor invasion is a multistep process. MMPs, by ECM and basement membrane degradation, can contribute to proliferation of neoplastic cells and to metastatic dissemination. Moreover, MMPs may play an important role in the control of neoangiogenesis and apoptosis (3).

Among the 23 human MMPs already described, gelatinases (MMP-2 and MMP-9) as well as their tissue inhibitors (TIMPs) seem to have the most important role in melanoma progression (2,4).

An immunohistochemical study demonstrated a correlation between high grade of MMP-2 positivity and low survival rate, with MMP-2 being considered an independent prognostic factor for survival (5). However, recent study using polymerase chain reaction technique couldn't show any positive association between genic MMP-2 expression and lymph nodes metastases (6).

Most of the studies on the role of MMPs in melanoma (as well as in cancer in general) are performed *in vitro* using neoplastic cell cultures, or *in vivo* in animal models (usually mice) (3,4). Given the importance of the interactions between peritumoral stromal and neoplastic cells in melanoma progression (7), including the fact that most of MMP-2 seems to

be produced by non-tumoral tissue (8), more *in vivo* studies on cutaneous melanoma correlating the expression of MMPs and the conventional histopathological findings that characterize disease progression are necessary (9).

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Tumor specimens**

A cross-sectional study was carried out using paraffin-embedded specimens of 55 consecutive patients diagnosed with primary melanoma diagnosis between January 2004 and January 2006 selected from the pathology archives of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), southern Brazil. Patients with the following findings were excluded from the study: mucosa lesions, relapsed lesions, melanoma metastasis, incisional biopsies or biopsies with insufficient material for proper microscopic staging. Clinical data were obtained by reviewing medical records.

The study was approved by the Research and Ethics Committee of HCPA.

### **Immunohistochemistry**

Paraffin-embedded specimens corresponding to the primary lesions were cut at a thickness of 3 micrometers and processed at the Center for Experimental Research of HCPA with human anti-MMP-2 antibody clone 17B11 class IgG2a kappa (Novocastra<sup>TM</sup>, England) and human anti-MMP-9 antibody clone 15W2 class IgG2 kappa (Novocastra<sup>TM</sup>, England) diluted 1:40 using an immunohistochemical technique already developed for this line of research (Doctoral dissertation by Renan Rangel Bonamigo Bonamigo (10) and Master's thesis by Renato Bakos (11) ). The immunohistochemical technique was counterstained with Giemsa as described by Sálvio *et al.* (12).

MMP-2 and MMP-9 positive controls were performed, respectively, on microscopic slides containing inflamed bowel and liver specimens. Slides without the primary antibody were used as negative controls. Positive and negative controls were previously tested and used concomitantly in every 20 slides.

### **Variables**

To assess the expression of MMP-2 and MMP-9, a qualitative ordinal score already tested in melanocytic nevi (11) was used, in which: 0: no expression; 1+: weak expression; 2+: moderate expression; and 3+: strong expression. Microscopic slides stained by immunohistochemistry were examined by two independent pathologists blinded to the results of the pathoanatomical analysis and to the corresponding H-E staining. The data were later cross-checked with those of the histopathological analysis, and if any data were missing, the slides stained with H-E were reassessed.

The site with the higher expression of MMP-2 and MMP-9 inside the tumor, in peritumoral endothelial cells and in peritumoral stroma as well as an average of these localizations were correlated with the following variables: sex; histological subtype (superficial spreading melanoma, lentigo maligna, lentigo maligna melanoma, nodular melanoma, acral lentiginous melanoma, spitzoid melanoma), Breslow thickness in millimeters (1: less than 1.01mm or *in situ*; 2: from 1.01 to 2.00 mm; 3: from 2.01 to 4.00 mm and 4: more than 4.00 mm); Clark level (I: confined to the epidermis; II: invasion of the papillary dermis; III: extends into and fills the papillary dermis; IV: infiltrates into the reticular dermis and V: infiltrates into the subcutaneous fat), presence of peritumoral or intratumoral inflammatory infiltrate (absent/nonbrisk *versus* brisk), mitotic index (number of mitoses per square millimeter), presence or absence of ulceration with more than 3mm in width ulceration and the presence or absence of histological regression.

### Statistical analysis

All the statistical analysis was carried out using the SPSS version 12 for Windows™. To assure interobserver homogeneity, the Kappa coefficient was used and a good agreement was considered when Kappa >0.6 (p<0.05).

The correlation measure between MMPs expressions and other qualitative ordinal variables (Breslow thickness, Clark level and mitotic rate) was analyzed according to the Goodman-Kruskal gamma coefficient ( $G_{[G-K]}$  coefficient) and considered statistically significant when  $p < 0.05$ . This coefficient is symmetric and its module ranges from zero (no association) to one (perfect association) (13).

The remaining associations were performed using Fisher's Exact Test and considered statistically significant when  $p < 0.05$ .

### RESULTS

The sample studied consisted of microscopic slides of 55 Caucasian patients, 30 men (54.5%) and 25 women (45.5%), with an age range from 32 to 72 years. Superficial spreading melanoma was the most frequent (47,4%) type, followed by nodular melanoma (14.5%), lentigo maligna (12.7%), lentigo maligna melanoma (10.9%), spitzoid melanoma and unclassifiable (9,1%) and acral lentiginous melanoma (5.4%). Table I shows the frequency of histological subtypes and their relation with patient's sex. Lesion's thickness is summarized in table II. There was a bimodal distribution with predominance of thin lesions (Breslow below 1 mm or *in situ*) and, to a lesser extent, of advanced lesions.

**Table I Frequency of histological subtypes and their relation with sex in 55 cases of melanoma.**

Subtype	Male	Female	Total
SSM	11 (20.0%)	15 (27.3%)	26 (47.3%)
NM	5 (9.1%)	3 (5.4%)	8 (14.5%)
LM	3 (5.4%)	4 (7.3%)	7 (12.7%)
LMM	6 (10.9%)	0 (0.0%)	6 (10.9%)
ALM	3 (5.4%)	0 (0.0%)	3 (5.4%)
UCM	2 (3.6%)	3 (5.4%)	5 (9.1%)
<b>Total</b>	<b>30 (54.5%)</b>	<b>25 (45.5%)</b>	<b>55 (100%)</b>

**SSM: superficial spreading melanoma; NM: nodular melanoma; LM: lentigo maligna; LMM: lentigo maligna melanoma; ALM: acral lentiginous melanoma; UCM: unclassified melanoma/spitzoid melanoma**

**Table II: Frequency of tumor thickness in 55 cases of melanoma**

Breslow	Frequency	%	Cumulative %
≤1 mm (or <i>in situ</i> )	29	52.7	52.7
From 1,01 to 2,00mm	5	9.1	61.8
From 2,01 to 4,00mm	4	7.3	69.1
More than 4 mm	17	30.9	100.0
Total	55	100.0	-

Most of the lesions infiltrated into the reticular dermis without penetrating into the subcutaneous fat (Clark IV), as shown in table III.

**Table III: Frequency of Clark invasion level in 55 cases of melanoma:**

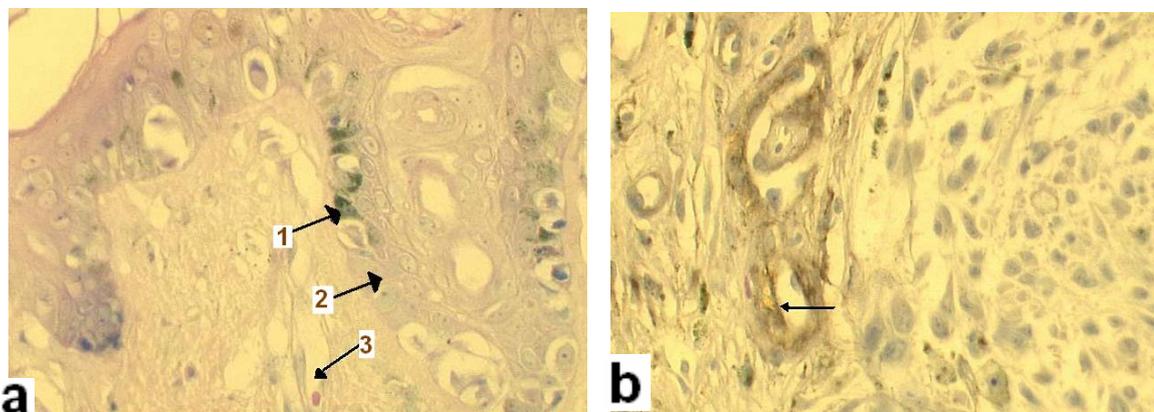
Clark level	Frequency	%	Cumulative %
I	9	16.4	14.5
II	9	16.4	32.7
III	7	12.7	45.5
IV	21	38.2	83.6
V	8	14.5	98.2
Not Specified	1	1.8	100.0
Total	55	100.0	

There was ulceration larger than 3 mm in 38.2% of the lesions. The presence of ulceration was much more common in nodular melanoma and in acral lentiginous melanoma than in the other subtypes ( $p < 0.01$ ).

There was histological regression in 27.3% of the cases. It was predominant in lentigo maligna and, to a lesser extent, in superficial spreading melanoma.

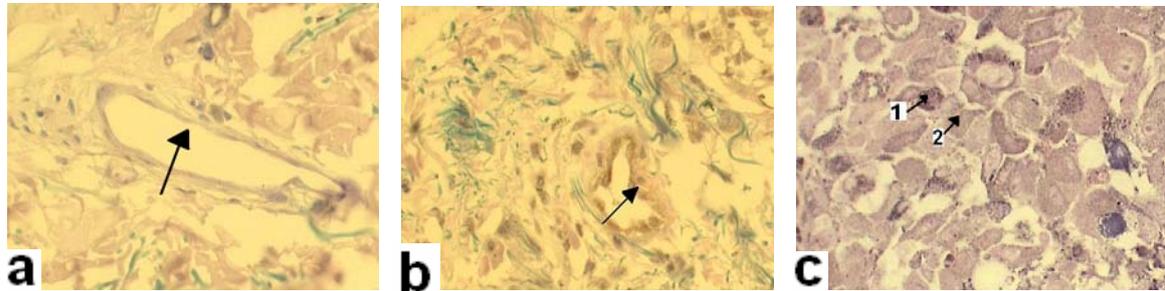
The inflammatory infiltrate was moderate to intense in 30.9% of the cases. The infiltrate was more common in lentigo maligna and superficial spreading melanoma.

MMPs -2 and -9 were assessed in endothelial, neoplastic and stromal cells (figures I and II).



**Figures Ia-b Immunohistochemical expression of MMP-2.** Counterstain: Giemsa. Original magnification: x40. **a** Greenish color inside the cytoplasm of some cells

does not represent immunoistochemical stain, but melanin granules stained with Giemsa instead (arrow 1). Neoplastic and endothelial cells show no MMP-2 expression (arrows 2 and 3, respectively). **b** Endothelial cells displaying high MMP-2 expression (arrow).



**Figures IIa-c Immunoistochemical expression of MMP-9.** Counterstain: Giemsa.

Original magnification: x40 (x50 in c) **a** Endothelial cells with no MMP-9 (arrow) **b** Endothelial cells with strong MMP-9 expression (arrow) **c** Neoplastic cells with high expression of MMP-9 (arrow 2). Arrow 1 shows melanin deposits stained with Giemsa.

There was no statistically significant association between the average MMP-2 and -9 expressions in endothelium, tumor and stromal cells with the degree of inflammatory infiltrate degree ( $p= 0.38$  and  $p= 0.69$ , respectively) as well as with the presence of histological regression areas ( $p= 0.22$  and  $p=0.69$ , respectively). Regarding MMPs-2 and -9 expression specifically in endothelial, tumor and stromal cells in relation to inflammatory infiltrate and regression areas, again, there was no relevant association ( $p>0,05$ ). There was also no association between the average MMP-9 expression and the presence of ulceration or patient's sex ( $p=0.91$ ). The same occurred in respect of MMP-9 expression specifically in endothelial, tumor and stromal cells in relation to ulceration and sex ( $p> 0.05$  for all).

The immunohistochemical expression of MMPs -2 and -9 in the various sites studied in relation to Clark level and Breslow thickness was analyzed according to the Goodman-Kruskal gamma correlation coefficient ( $G_{[G-K]}$  coefficient) and are shown below (table III). Its correlation module conforms to the following scale: 0 (none); up to 0.1 (trivial); up to 0.3

(weak); up to 0.5 (moderate); up to 0.7 (strong); up to 0.9 (very strong); greater than 0.9 (almost perfect); and 1 (perfect).

**Table IV: Correlation between the immunohistochemical expression of MMPs -2 e -9 inside neoplastic, endothelial and peritumoral stromal cells, as well as the average of these sites, with Breslow thickness and Clark level**

	MMP-2		MMP-9	
	Breslow	Clark	Breslow	Clark
<b>Neoplasia</b>	0.31 (0.04)	0.20 (0.19)	0.67 (<0.01)	0.21(0.27)
<b>Endothelium</b>	0.36 (0.05)	0.32 (0.05)	0.15 (0.42)	0.13 (0.45)
<b>Stroma</b>	0.57 (<0.01)	0.52 (<0.01)	0.22 (0.26)	0.28 (0.07)
<b>Total</b>	0.52 (<0.01) <sup>1</sup>	0.45 (<0.01) <sup>2</sup>	0.28 (0.20) <sup>3</sup>	0.20 (0.29) <sup>4</sup>

G<sub>[G-k]</sub> (p-value)

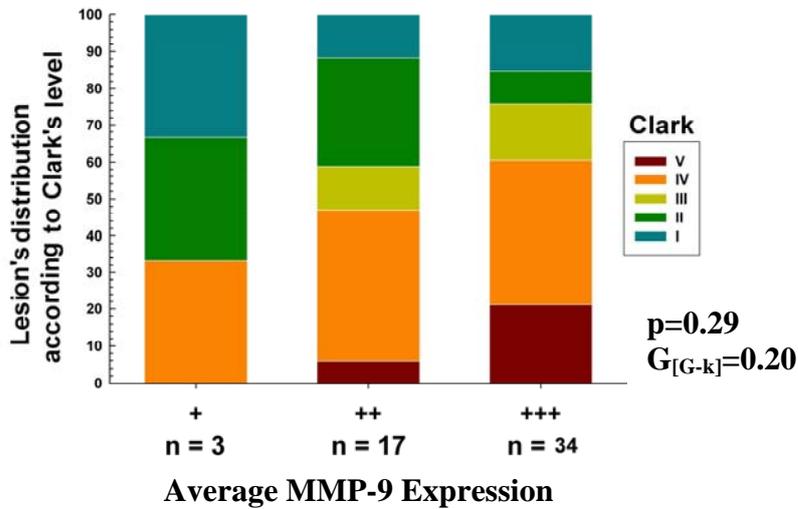
<sup>1</sup>Average MMP-2 expression in neoplastic, endothelial and stromal cells *versus* Breslow thickness.

<sup>2</sup>Average MMP-2 expression in neoplastic, endothelial and stromal cells *versus* Clark level.

<sup>3</sup>Average MMP-9 expression in neoplastic, endothelial and stromal cells *versus* Breslow thickness.

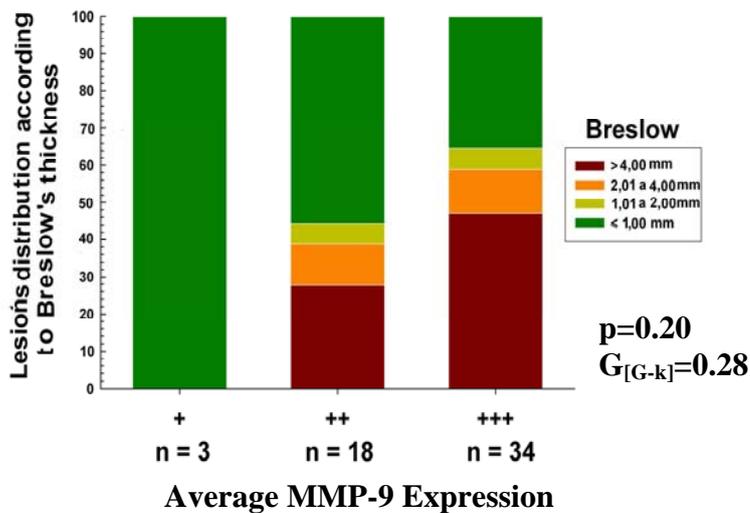
<sup>4</sup>Average MMP-9 expression in neoplastic, endothelial and stromal cells *versus* Clark level

There was a weak, no statistically significant correlation between the average expression of MMP-9 in the tumor, endothelial and stromal cells with Clark level and Breslow thickness (p= 0.29 and 0.20, respectively) (figures III and IV).



**Figure III: Average immunohistochemical expression of MMP-9 in 54 cases of melanoma according to Clark level**

OBS: Clark level could not be assessed in one case



**Figure IV: Average immunohistochemical expression of MMP-9 in 54 cases of melanomas according to Clark level**

There was a positive, strong, and statistically significant correlation between intratumoral MMP-9 and Breslow thickness ( $G_{[G-k]} = 0.67$  and  $p = 0.001$ ) (table IV).

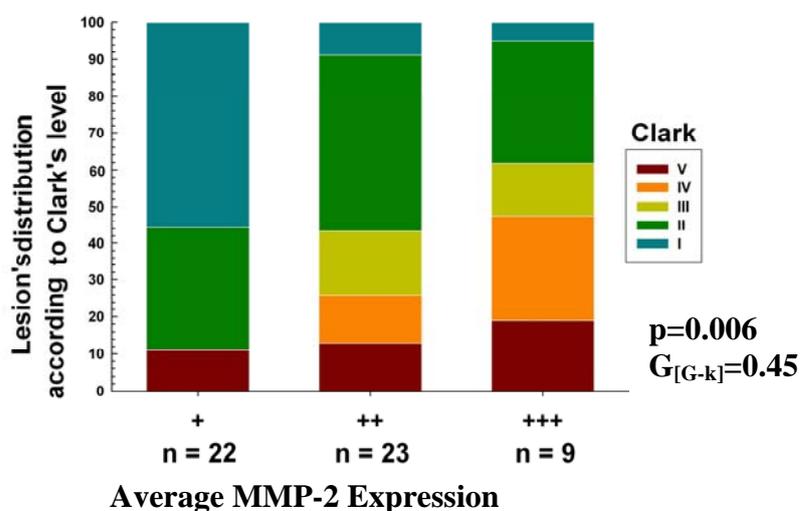
In order to make graphics and show them in a didactically manner (figures III, IV, V and VI) the average values were distributing as the following: from 0.00 to 1.00: +; more than 1.00 to 2.00: ++ and more than 2.00 to 3.00: +++.

Mitotic rate was moderately and statistically significant correlated with the average expression of MMP-2 ( $G_{[G-K]} = 0.51$  and  $p=0.004$ ). There was a stronger relation with the peritumoral stroma ( $G_{[G-K]} = 0.52$  and  $p=0.002$ ) and, to a lesser extent, with the endothelium ( $G_{[G-K]} = 0.39$  and  $p=0.02$ ) (table IV). There was no relation between mitotic rate and the average expression of MMP-9 ( $p=0.58$ ), intratumoral MMP-9 ( $p=0.27$ ), endothelial MMP-9 ( $p=0.42$ ) and stroma ( $p=0.13$ ).

Ulcerated lesions exhibited a higher average expression of MMP-2 ( $p=0.034$ ), more specifically in the stroma ( $p=0.013$ ). This association did not exist at the other sites studied ( $p>0.05$ ).

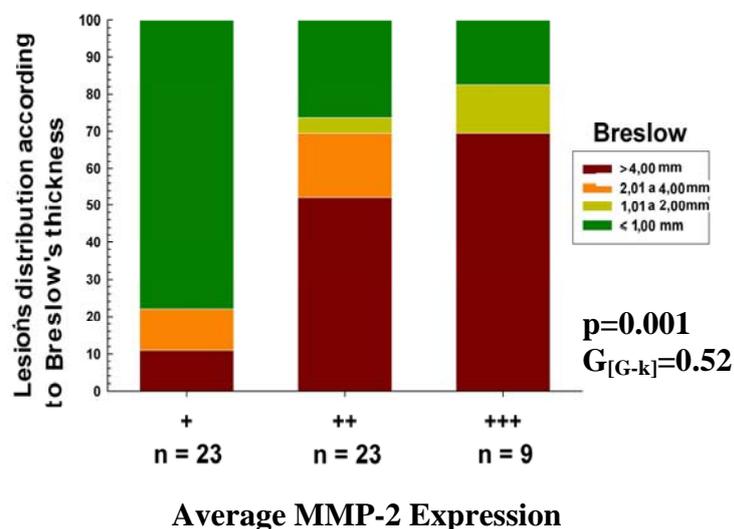
The average expression of MMP-2 was more intense in females patients ( $p=0.01$ ). The same did not occur concerning MMP-9 ( $p=0.91$ ).

The average MMP-2 expression showed a statistically significant correlation with Clark level and Breslow thickness. ( $p=0.006$  and  $p=0.001$ , respectively) (figures IV and V).



**Figure V: Average immunohistochemical expression of MMP-2 in 54 cases of melanoma according to Clark level**

OBS: Clark level could not be assessed in one case.



**Figure VI: Average immunohistochemical expression of MMP-2 in 55 cases of melanoma according to Breslow thickness**

## DISCUSSION

Melanoma is a severe type of malignant neoplasm with high probability of metastatic spread and with poor prognosis in its more advanced stages (14).

Since the initial studies that correlated the likelihood of metastatic spread of neoplasms with the enzyme degradation of the basement membrane almost three decades ago (15), there has been a growing interest in studying these enzymes and their interaction with neoplastic cells as well as with the stroma (3).

There is evidence that MMP-2 and MMP-9 play an important role in the progression of melanomas, but some issues still have to be further elucidated, especially due to the paucity of in vivo studies on human lesions (16).

The commonly used hematoxylin-eosin counterstain may not be suitable for immunohistochemistry use in highly pigmented, melanin-rich lesions. In these situations, the brown pigment formed by the DAB chromogen cannot be easily differentiated from the brown melanin granules. Giemsa staining was successfully used by Sálvio *et al.* to distinguish neoplastic cells from melanophages in thin melanomas with brisk inflammatory infiltrate. By using this method, the melanin pigment was stained greenish-blue whereas the Melan-A positive melanocytes were colored brown. Macrophages with Melan-A negative results contained only coarse greenish-blue granules in their cytoplasm (12). We also used Giemsa counterstain for MMP-2 and MMP-9 and we eventually obtained good results (Figures I and II).

MMP-2 is secreted as a proenzyme (pro-MMP-2) and is activated by making a complex with the tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP) at a low concentration plus a membrane metalloproteinase (MT-MMP) (1, 16).

Even though immunohistochemistry does not allow the identification of the active form of the enzyme, Ohnishi *et al.* observed a constant co-localization of MMP-2 with MT2-MMP and MT3-MMP in melanomas. Therefore, MMP-2, when present in the melanoma, is probably found in its active form (17).

Although the determination of metalloproteinase expression by immunohistochemistry is a relatively subjective method, it had an acceptable interobserver Kappa coefficient ( $p < 0.05$ ) for all variables.

Väisänen *et al.* (5) showed that the immunohistochemical expression of MMP-2 is a prognostic factor that does not depend on other histological parameters for primary cutaneous melanoma. In addition, male individuals showed a higher enzyme expression, which may explain why the male gender is considered a factor of poorer prognosis in some previous

studies (5). In the present study, the mean expression (tumor/endothelium/stroma) of MMP-2 was higher among women.

Clark level, and mainly Breslow thickness, showed a statistically significant correlation with the mean expression of MMP-2 (neoplasm/endothelium/tumor). A stronger correlation was found with the peritumoral extracellular matrix, both in Clark and Breslow classifications. The findings confirm those obtained by *in vivo* and *in vitro* studies carried out by Hofmann *et al.* in which there was a direct relationship between the progression of the melanocytic lesion and the expression of MMP-2. In these studies, there was co-localization of MMP-2 with membrane 1 metalloproteinase (MT1-MMP), indicating that the active form of the enzyme is probably involved (18).

Even though van den Oord *et al.* asserted that the immunohistochemical expression of MMP-9 is more commonly associated with initial lesions (horizontal growth stage) with progressive loss as the melanoma advances (19), our study showed that there is no significant (positive or negative) association between the mean expression of MMP-9 and the progression of melanoma. Curiously enough, there was an association with Breslow thickness in neoplastic intratumoral cells.

Nontraumatic ulceration greater than 3 mm in diameter represents a prognostic factor for melanoma, being included in current staging protocols (20). Its mechanism may be related to a reduction in blood supply due to rapid tumor growth into the dermis, which explains its higher frequency in fast-growing melanoma, as is the case of nodular melanoma (21). In this study, eight nodular melanomas and three acral lentiginous melanomas were ulcerated. Other explanations for this phenomenon include the fragility and consequent rupture of the epidermis due to the infiltration of neoplastic cells (21). Possibly, metalloproteinases are involved in this process, although there are no specific studies on this issue (16). We found a

higher frequency of ulceration in lesions with higher mean expression of MMP-2 than in lesions with a lower expression. The same does not apply to the MMP-9.

Melanoma often has areas of histological regression, especially in thin lesions. Even though the role of partial histological regression in the prognosis of this malignant neoplasia is still controversial, it is believed that many cases of metastatic melanoma with unknown primary tumor can be explained by the total regression of the primary tumor (21). Melanoma cell culture conducted in a murine model indicated that fibroblasts are the major source of MMP-2 during the progression of melanoma (8). Regardless of whether these cells, together with lymphocytes, have an important role in the regression of the melanoma (21), no statistically significant association was found between the expression of MMP-2 and MMP-9 and the presence of histological regression in the present study.

The presence of lymphocytic inflammatory infiltrate can be or not later followed by areas of regression (21). There are some studies that demonstrate that the presence of pronounced intratumoral infiltrate is a good prognostic factor (22).

In a cutaneous carcinogenic model, inflammatory cells such as neutrophils, macrophages and mast cells produced by the bone marrow constitute the cellular source of MMP-9 (23). There was no relationship between the presence of peritumoral or intratumoral inflammatory infiltrate and the expression of MMPs in our study.

Mitotic rate, usually expressed as the number of mitoses in 10 high-powered fields, has been suggested as an important prognostic factor in a study with 3,661 Australian patients (24). Patients with a very low mitotic rate (less than one mitosis in 10 high-powered fields) had a lower mean expression of MMP-2 than other patients. However, no statistically significant association was observed across the other groups.

The results of this study confirm those obtained by previous studies, indicating a probable association between the immunohistochemical expression of MMP-2 and, less intensely, of MMP-9, and the progression of cutaneous melanoma.

### **Acknowledgements**

We are indebted to Neiva Copetti for her assistance with the immunohistochemical techniques.

This work was supported by *Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos* (Research Incentive Fund) of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA), Brazil.

### **REFERENCES**

1. Woessner JF, Nagase H. Matrix Metalloproteinases and TIMPs. 1 ed: Oxford University Press; 2002.
2. Visse R, Nagase H. Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases: Structure, Function, and Biochemistry. *Circ Res* 2003;92:827-39.
3. Deryugina EL, Quigley JP. Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 2006;25:9-34.
4. Hofmann UB, Westphal JR, van Muijen GNP, Ruiter DJ. Matrix Metalloproteinases in Human Melanoma. *J Invest Dermatol* 2000;115(3):337-44.
5. Väisänen A, Kallioinen M, Taskinen PJ, Turpeenniemi-Hujanen T. Prognostic value of MMP-2 immunoreactive protein (72 kD type IV collagenase) in primary skin melanoma. *J Pathol* 1998; 186. (1):51-8.
6. Otto K, Starz H, Becker JC, Schrama D. Overexpression of Matrix Metalloproteinases, Chemokines, and Chemokine Receptors Relevant for Metastasis in Experimental Models Not an Indication of Lymph Node Metastases in Human Melanoma. *Arch Dermatol* 2007;143(7):947-8.
7. Ruiter D, Borgenieder T, Elder D, Herlyn M. Melanoma-stroma interactions: structural and functional aspects. *Lancet Oncol* 2002;3:35-43.
8. Hofmann UB, Eggert AAO, Blass K, Bröcker EB, Becker JC. Stromal cells as the major source for matrix metalloproteinase-2 in cutaneous melanoma. *Arch Dermatol Res* 2005;297(4):154-60.

9. Walker RA, Woolley DE. Immunolocalisation studies of matrix metalloproteinases-1, -2 e -3 in human melanoma. *Virchows Arch* 1999;435:574-9.
10. Bonamigo RR. A expressão imunoistoquímica das metaloproteinases-2 e -9 da Matriz na rosácea inflamatória.[Tese] Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2003.
11. Bakos RM. Efeitos da Radiação Ultravioleta B na expressão imunoistoquímica das metaloproteinases -2 e -9 em nevos melanocíticos. [dissertação de mestrado] Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2005.
12. Salvio AG, Marques MEA. Imuno-histoquímica para identificação de células neoplásicas no infiltrado ativo de melanomas finos. *J Bras Patol Med Lab* 2006;42(2):143-8.
13. Goodman LA, Kruskal WH. Measures of association for cross classifications. *J Am Stat Assoc* 1994; 49: 732-64.
14. Miller JA, Mihm Jr. MC. Melanoma. *N Eng J Med* 2006;355(1):51-65.
15. Liotta LA, Tryggvason K, Houben R, Garbisa S, Hart I, Foltz CH, Shafie S. Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen. *Nature* 1980;284:67-8.
16. Hofmann UB, Houben R, Bröcker EB, Becker JC. Role of matrix metalloproteinases in melanoma cell invasion. *Biochimie* 2005;87:307-14.
17. Ohnishi Y, Tajima S, Ishibaschi A. 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* 2001;11(5):420-3.
18. Hofmann UB, Westphal JR, Zendman AJ, Becker JC, Ruitter DJ, van Muijen GNP. Expression and Activation of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and its co-localization with membrane-type matrix metalloproteinase 1 (MT1-MMP) correlate with melanoma progression. *J Pathol* 2000;191:245-56.
19. Van den Oord JJ, Peaman L, Opdenakker G, de Wolf Peeters C. Expression of gelatinase B and the extracellular matrix metalloproteinase inducer EMPRIN in benign and malignant pigment cell lesions of the skin. *Am J Pathol* 1997;151:665-70.
20. Balch CM, Buzaid AC, Soong SJ, Atkins MB, Cascinelli N, Coit DG, et al. Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. *J Clin Oncol* 2001;19 (16):3635-48.
21. Barnhill RL. Pathology of Malignant Melanoma. 1 ed. New York: Springer; 2004.

22. Clemente CG, Mihm MC Jr, Bufalino R, Zurrada S, Collini P, Cascinelli N. Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma. *Cancer* 1996;77(7):1303-10.
23. Coussens LM, Tinkle CL, Hanahan D, Werb Z. MMP-9 supplied by bone marrow-derived cells contributes to skin carcinogenesis. *Cell* 2000;103:481-90.
24. Azzola MF, Shaw HM, Thompson JF, Soong SJ, Scolyer RA, Watson GF, et al. Tumor mitotic rate is a more powerful prognostic indicator than ulceration in patients with primary cutaneous melanoma: an analysis of 3661 patients from a single center. *Cancer* 2003;97(6):1488-98.

### 13. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Desde que foi dado início à era de estudos das metaloproteinases, no início da década de 60, por Gross e Lapiere, publicações sobre essas enzimas têm crescido de forma exponencial. O papel das metaloproteinases nas neoplasias em geral e no melanoma é tema extremamente complexo e atual.

Tal complexidade pode ser resumida pelo fato de que as MMPs promovem a progressão tumoral não apenas através da degradação da MEC, como inicialmente se acreditava, mas também através de funções de sinalização, controle da apoptose, angiogênese, regulação da resposta imune, promoção de metástases e crescimento tumoral.

Especificamente no melanoma, as MMPs -1, -2, -9, -13, MT1-MMP além de seus inibidores naturais (TIMPS), parecem ser as enzimas mais envolvidas.

Nosso trabalho confirmou dados da literatura que indicam uma expressão maior da MMP-2 à medida que a neoplasia progride. O mesmo não ocorreu, de forma geral, com a MMP-9. Aliás, os trabalhos com técnica de imunistoquímica de MMP-9 têm sido conflitantes ou inconclusivos.

A identificação das enzimas associadas à invasão neoplásica e a elucidação de seu papel neste processo são importantes para a exploração de novos métodos para diagnóstico, avaliação prognóstica e padronização de novas estratégias terapêuticas.

O papel das MMPs como diagnóstico de melanoma parece ser muito limitado. Entretanto, as MMPs podem ter, futuramente, um papel prognóstico relevante. Alguns estudos demonstram, em certos casos, haver uma maior expressão de algumas MMPs em órgãos-alvo para metástases sistêmicas, antes mesmo da chegada das células tumorais. É possível que a presença da enzima nesses locais indique um maior risco para doença sistêmica. Nestes casos, uma abordagem terapêutica mais agressiva poderia ser justificada.

Estudos preliminares indicam que a dosagem sérica de MMP-2 poderia ser um fator preditivo para metástases. Há um único estudo envolvendo a expressão imunoistoquímica da MMP-2 na lesão primária do melanoma cutâneo com seu prognóstico. Neste estudo, a MMP-2 foi considerada fator prognóstico independente.

Animados com os resultados de estudos em culturas de células neoplásicas (incluindo células de melanoma), bem como em modelos animais (sobretudo murinos) que indicaram que a inibição das MMPs -2 e -9 vinha acompanhada de uma menor frequência de metástases, pesquisadores testaram vários inibidores sintéticos de metaloproteinases em humanos em vários tipos de neoplasias. O resultado desses ensaios clínicos, na quase totalidade dos casos, foi desanimador pela baixa eficácia e alto índice de efeitos colaterais. Isso demonstra que, possivelmente, modelos animais e cultura de células devam ser complementados com estudos com tecido humano para investigação da relação MMPs/melanoma tendo em vista a importância da interação das células neoplásicas com o organismo humano.





**Anexo IV: Técnica laboratorial de imunistoquímica utilizada**

Desparafinar – Xilol – 3x de 10 segundos  
Hidratar – álcool 100% - 3 passagens de 5 segundos  
Lavar em água corrente e destilada  
Tampão PBS 3x de 5 minutos  
Tampão Citrato – banho Maria -20 minutos a 90°C  
Desligar o banho Maria e deixar as lâminas dentro por mais 20 minutos  
Retirar as lâminas e deixar por 15 minutos em temperatura ambiente  
Lavar em água corrente e destilada  
Deixar no Tampão PBS – 3x de 5 minutos  
Peróxido de hidrogênio (preparado com água destilada) a 5% 2 x de 15 minutos  
Lavar em água corrente e destilada  
Deixar no Tampão PBS 3x de 5 minutos  
Soro normal em PBS (leite em pó preparado com PBS) a 5% - 30 minutos  
Lavar com água corrente e destilada  
Deixar no Tampão PBS 3x de 5 minutos  
Circular os cortes com caneta DAKO PEN®  
Pingar o anticorpo (diluição 1:40)  
Deixar em câmara úmida – a noite toda na geladeira ou por 1 hora em temperatura ambiente (câmara escura); usar pipetas de 100µl para pingar o anticorpo  
Tirar as lâminas da câmara escura e lavar uma por uma com água destilada  
Deixar no Tampão PBS 3x de 5 minutos  
Pingar LSAB (Avidina Biotina) e deixar em câmara úmida por 30 minutos ( câmara escura)  
Deixar no PBS 3x de 5 minutos  
Pingar o LSAB (Avidina Biotina) em outro frasco e deixar em câmara úmida por 30 minutos ( câmara escura)  
Deixar no Tampão PBS 3x de 5 minutos  
Pingar DAB e esperar 25 segundos  
Água destilada (após o DAB) colocando as lâminas na cestinha dentro do pote de água destilada  
Lavar em água corrente e destilada  
Coloração de Giemsa por 6 minutos  
Álcool 100% - 2 passagens; xilol 2 passagens  
Montar