

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**EFEITOS AGUDOS DA RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA B NA EXPRESSÃO  
IMUNOISTOQUÍMICA DAS METALOPROTEINASES -2 e -9 EM NEVOS  
MELANOCÍTICOS**

Autor: Renato Marchiori Bakos

Orientador: Prof. Dr. Lucio Bakos

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Isabel Albano Edelweiss

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

2005

## 1. DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Lucio e Margaret, por todo amor e carinho que sempre tiveram por mim, me orientando e auxiliando a atingir meus objetivos. Vocês são exemplos fantásticos de pessoas e profissionais, verdadeiras fontes de inspiração para mim.

Dedico também ao meu irmão Maurício, verdadeiro amigo de toda hora, por quem tenho uma profunda admiração, por seu caráter e sua personalidade.

Dedico à minha noiva, Mariana, por ter tido paciência e companheirismo em todos os momentos. Por todo seu carinho, que serviu de estímulo para conclusão desse trabalho.

## 2. AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Lucio Bakos, pelo entusiasmo com que exerce a Dermatologia, o qual transmite a seus alunos e orientandos. Agradeço pela honrosa oportunidade de tê-lo como meu orientador e poder perceber a excelência com que lida às questões técnico-científicas e às relações pessoais, neste tipo de contato.

À professora Dra. Maria Isabel Edelweiss, dedicada co-orientadora, por transmitir seu encanto em ensinar e pesquisar, sendo grande incentivadora desse trabalho e de ajuda preciosa na avaliação das lâminas histológicas.

Ao professor Dr. André Cartell por toda sua dedicação e disponibilidade na avaliação de lâminas e por ter compartilhado, em todos estes anos, seu convívio e seu vasto conhecimento em Dermatopatologia.

Ao Dr. José Carlos Mariante pela excelência em seu estudo, imprescindível para a realização deste, e por toda sua prestatividade e amizade nas trocas de informações.

À professora Dra. Tania Ferreira Cestari, responsável por importante parte do meu conhecimento dermatológico, por servir de exemplo de pesquisadora e dermatologista.

À bióloga Ivana Höfke de Souza Gallota e sua equipe pelo importante auxílio na confecção das lâminas de imunistoquímica e pela fraterna recepção que proporcionaram em seu laboratório.

A Dr. Mário Bernardes Wagner pelo seu talento e apoio na análise bioestatística.

Ao professor Dr. Renan Rangel Bonamigo por todos seus conselhos e conhecimentos passados durante as diferentes etapas do projeto.

À Dra. Nathália Matas Solés pelo seu inestimável auxílio durante todo o projeto. Ainda como acadêmica da Faculdade de Medicina da UFRGS e após sua graduação, sempre colaborando prontamente e com muita eficiência.

Ao professor Dr. Luiz Fernando Bopp Muller pela experiência transmitida e pela maneira descontraída com que ensina a Dermatologia.

À Dra. Gisela de Sousa Del Pino pela sua contribuição ao meu conhecimento de histopatologia cutânea.

Às Dras Marlene Laks Weissbluth, Márcia Salete Zampese, Isabel Cristina Palma Kuhl, Ane Simões Pires, Mirian Pargendler Peres, Suzana Braga pela fraterna convivência durante minha formação e por todos os ensinamentos.

Aos colegas e ex-residentes do serviço de Dermatologia do HCPA Drs(as). Alessandra Baltazar, Ana Paula Manzoni, Beatriz Martignago, Cíntia Gründler, Cristiane Benvenuto-Andrade, Cristine K. Kraemer, Fabiano Pacheco, Fernanda Freitag, Gislaine Ceccon, Josiane Viecili, Juliano Grock, Letícia Schenato, Mauren Seidl, Patrícia Salenave, Roberto Rezende, Sandro Duarte, Tobias Orlandini pelo seu companheirismo e prazerosa amizade.

Às Dras Vanessa Santos Cunha e Taciana Dal'Forno Dini, colegas de mestrado e de Dermatologia, por dividirem comigo importantes tarefas, durante esse curso, com extrema cumplicidade.

Aos atuais residentes e cursistas em Dermatologia do HCPA, Carolina Lenhardt, Clarissa Prati, Cláudia C. Zanotti, Larissa Schütz, Leandra Camini, Manoela Porto, Mariana Barbato, Mariana Soirefmann, Perla D. de Castro, Sérgio Luiz Bernardes, pelo incentivo em diversas das atividades durante o projeto.

À acadêmica da Faculdade de Medicina da UFRGS Laura Moreira pela sua prestatividade e pelo seu apoio no final deste projeto.

À Dra. Suzana Vozari Hampe, ao Dr. Sérgio Dornelles e à Dra. Miriam Gutierrez pelo incentivo dado a um jovem dermatologista.

Aos funcionários dos Serviços de Dermatologia e Patologia, em especial a Sra. Bernadete Hahmeyer e o Sr. Adelmo Soliman por sempre se mostrarem dispostos a auxiliar nas mais distintas tarefas propostas.

Aos professores do programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul pela doação pessoal, conhecimentos e incentivo que oferecem nesta difícil e bem cumprida tarefa de formar novos mestres e doutores.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro sob a forma de bolsa de Mestrado.

## SUMÁRIO

<b>1. DEDICATÓRIA.....</b>	<b>02</b>
<b>2. AGRADECIMENTOS.....</b>	<b>03</b>
<b>3. LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>08</b>
<b>4. LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>11</b>
<b>5. LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>14</b>
<b>6. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
<b>7. REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>17</b>
7.1. Nevos melanocíticos.....	17
7.2. Melanoma.....	26
7.3. Associação de nevos e melanoma.....	30
7.4. Radiação ultravioleta.....	34
7.5. Matriz extracelular do derma.....	42
7.6. Metaloproteinases da matriz.....	42
<b>8. OBJETIVOS.....</b>	<b>59</b>
8.1. Objetivo principal.....	59
8.2. Objetivos secundários.....	59
<b>9. REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>60</b>
<b>10. ARTIGO EM INGLÊS.....</b>	<b>89</b>
<b>11. ARTIGO EM PORTUGUÊS.....</b>	<b>121</b>
<b>12. ANEXOS.....</b>	<b>154</b>
12.1. Anexo A – Protocolo de análise das lâminas de imunistoquímica de MMP-2 e de H-E pelos avaliadores.....	154
12.2. Anexo B – Protocolo de análise das lâminas de imunistoquímica de MMP-9 pelos avaliadores .....	155

12.3. Anexo C – Fotografia do exame histopatológico de nevo melanócito irradiado.....	156
12.4. Anexo D – Fotografias das lâminas de imunistoquímica das MMP-2 e – 9 nos lados irradiados e não irradiados.....	157

### 3. LISTA DE ABREVIATURAS

AP-1 - proteína ativadora-1 (*activator protein-1*)

BP180 – Antígeno 180 kDa do penfigóide bolhoso (*Bullous Pemphigoid 180 kDa Antigen*)

CBC – carcinoma basocelular

CDC – Centro para Controles de Doenças (*Centers for Disease Control*)

DEM – dose eritematosa mínima

DNA – ácido desoxirribonucléico (*deoxyribonucleic acid*)

ELI – escore lado irradiado

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

ELNI - escore lado não irradiado

EUA – Estados Unidos da América

HCPA - Hospital de Clínicas de Porto Alegre

H-E – hematoxilina e eosina

HLA – antígeno leucocitário humano (*human leukocyte antigen*)

HMB-45 – *Human Melanoma Black – 45*

IC – intervalo de confiança

ICC – coeficiente de correlação entre classes (*intraclass correlation coefficient*)

IL-1 - interleucina-1 (*interleukin-1*)

IL-4 - interleucina-4 (*interleukin-4*)

IL-10 – interleucina-10 (*interleukin-10*)

INCA – Instituto Nacional do Câncer

IS – *irradiated side*

ISS – *irradiated side score*

KDa – quilodáton (*kilodalton*)



LI – lado irradiado

LNI – lado não irradiado

MED – *minimal erythema dosis*

mm – milímetros (*milimeter*)

μm – micrômetros (*micrometer*)

MMP – metaloproteinase da matriz (*matrix metalloproteinase*)

MT-MMP - metaloproteinase da matriz membrana ( *membrane-type matrix metalloproteinase*)

NET – necrólise epidérmica tóxica

NFκB - fator nuclear kappa B (*nuclear factor kappa B*)

NIS – *non-irradiated side*

NISS - *non-irradiated side score*

nm – nanômetros (*nanometer*)

NMA – nevo melanocítico adquirido

NMJ – nevo melanocítico juncional

NMC – nevo melanocítico composto

NMI – nevo melanocítico intradérmico

PCR – reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction*)

PMA - acetato de forbol miristato (*phorbol 12-myristate-13-acetate*)

RNA – ácido ribonucleico (*ribonucleic acid*)

RNA<sub>m</sub> - ácido ribonucleico mensageiro (*messenger ribonucleic acid*)

RR – risco relativo

RUV – radiação ultravioleta

TGF-β - fator de crescimento transformante-β (*transforming growth factor-β*)

TIMP – inibidor tecidual das metaloproteinases (*tissue inhibitor of metalloproteinases*)

TNF-α - fator de necrose tumoral-α (*tumor necrosis factor-α*)

UVA – ultravioleta A (*ultraviolet A*)

UVB - ultravioleta B (*ultraviolet B*)

UVC - ultravioleta A (*ultraviolet C*)

UFRGS - Universidade Federal do Rio Grande do Sul

VEGF - fator de crescimento vascular endotelial ( *vascular endothelial growth factor*)

W/cm<sup>2</sup> – watts por centímetro quadrado

#### 4. LISTA DE FIGURAS

##### REVISÃO DA LITERATURA

**FIGURA 1:** Esquema das estruturas e componentes das metaloproteinases..... 45

##### ARTIGO EM INGLÊS

**FIGURE 1:** Differences between mean scores (ISS – NISS) of immunohistochemical expression of MMP-2 considering irradiated and non-irradiated sides..... 116

**FIGURE 2:** Differences between mean scores (ISS – NISS) of immunohistochemical expression of MMP-9 considering irradiated and non-irradiated sides..... 117

**FIGURE 3:** A. Immunohistochemical expression (1+) of MMP-2 of keratinocytes on non-irradiated side; B. Immunohistochemical expression (2+) of MMP-2 of keratinocytes on irradiated side..... 118

**FIGURE 4:** A. Immunohistochemical expression (1+) of MMP-2 of epidermal melanocytes (→) on non-irradiated side; B. Immunohistochemical expression (2+) of MMP-2 of epidermal melanocytes (→) on irradiated side..... 119

**FIGURE 5:** A. Immunohistochemical expression (1 +) of MMP-9 of endothelial cells on non-irradiated side (→); B. Immunohistochemical expression (2+) of MMP-9 of endothelial cells on irradiated side (→); C. Immunohistochemical expression (3+) of MMP-9 of fibroblasts on irradiated side (→)..... 120

##### ARTIGO EM PORTUGUÊS

**FIGURA 1:** Gráfico das diferenças de escores médios (ELI – ELNI) de expressão imunoistoquímica de MMP-2 observados entre os lados irradiados e não irradiados..... 149

**FIGURA 2:** Gráfico das diferenças de escores médios (ELI – ELNI) de expressão imunohistoquímica de MMP-9 observados entre os lados irradiados e não irradiados..... 150

**FIGURA 3:** A. Expressão imunohistoquímica (1+) de MMP-2 nos queratinócitos de lado não irradiado; B. Expressão imunohistoquímica (2+) de MMP-2 nos queratinócitos de lado irradiado..... 151

**FIGURA 4:** A. Expressão imunohistoquímica (1+) de MMP-2 em melanócitos epidérmicos (→) de lado não irradiado; B. Expressão imunohistoquímica (2+) de MMP-2 em melanócitos epidérmicos (→) de lado irradiado..... 152

**FIGURA 5:** A. Expressão imunohistoquímica (1+) de MMP-9 em células endoteliais de lado não irradiado (→); B. Expressão imunohistoquímica (2+) de MMP-9 em células endoteliais de lado irradiado (→); C. Expressão imunohistoquímica (3+) de MMP-9 em fibroblastos de lado irradiado (→)..... 153

## **ANEXO C**

**FIGURA C1:** Hiperplasia de melanócitos com aumento de núcleos e citoplasma..... 156

## **ANEXO D**

**FIGURA D1:** A. Expressão imunohistoquímica (1+) de MMP-2 nos queratinócitos de lado não irradiado; B. Expressão imunohistoquímica (2+) de MMP-2 nos queratinócitos de lado irradiado; C. Expressão imunohistoquímica (3+) de MMP-9 nos queratinócitos de lado irradiado..... 157

**FIGURA D2:** A. Expressão imunohistoquímica (1+) de MMP-2 em melanócitos epidérmicos de lado não irradiado (→); B. Expressão imunohistoquímica (2+) de MMP-2 em melanócitos epidérmicos de lado irradiado (→)..... 158

<b>FIGURA D3:</b> A.Expressão imunoistoquímica (1+) de MMP-9 em células endoteliais de lado não irradiado (→); B. Expressão imunoistoquímica (2+) de MMP-9 em células endoteliais de lado irradiado (→); C. Expressão imunoistoquímica (3+) de MMP-9 em células endoteliais de lado irradiado (→).....	159
<b>FIGURA D4:</b> Expressão imunoistoquímica (3+) de MMP-9 em fibroblastos de lado irradiado (→).....	160
<b>FIGURA D5:</b> Expressão imunoistoquímica (2+, *) de MMP-2 em queratinócitos, em melanócitos dérmicos (2+, ♣) e melanócitos epidérmicos (2+, →) de lado irradiado.....	161
<b>FIGURA D6:</b> Expressão imunoistoquímica (3+, *) de MMP-9 em queratinócitos, em melanócitos dérmicos (2+, ♣) e melanócitos epidérmicos (2+, →) de lado irradiado.....	162

## 5. LISTA DE TABELAS

### ARTIGO EM INGLÊS

**TABLE 1:** Semi-quantitative analysis of MMP-2 in irradiated and non-irradiated sides 114

**TABLE 2:** Semi-quantitative analysis of MMP-9 in irradiated and non-irradiated sides 115

### ARTIGO EM PORTUGUÊS

**TABELA 1:** Análise semi-quantitativa da MMP-2 nos lados irradiados e não irradiados 147

**TABELA 2:** Análise semi-quantitativa da MMP-9 nos lados irradiados e não irradiados 148

## 6. INTRODUÇÃO

Nevos são malformações que podem ser originadas a partir de diversos tipos de tecidos (1). Os nevos melanocíticos são afecções dermatológicas formadas por acúmulo de melanócitos (“ninhos” de células névicas), sendo extremamente comuns. Os nevos melanocíticos adquiridos, em sua grande maioria, desenvolvem-se, no ser humano, após a infância, principalmente durante a adolescência e juventude. São considerados marcadores importantes de risco para desenvolvimento do melanoma, principalmente quando presentes em grande número (mais de 40), podendo, também, ser precursores desta lesão maligna (2-4).

A radiação ultravioleta (RUV) tem sido considerada o principal fator de risco ambiental para o câncer cutâneo, principalmente o espectro chamado eritematogênico, que corresponde à radiação ultravioleta B (UVB) (5-7). É ele o responsável pelo dano agudo na pele (queimaduras solares) (2). As queimaduras, quando se sucedem, tornam-se um importante fator de risco para o surgimento do melanoma, fato já confirmado em diversos estudos, inclusive no nosso meio (8). Outros trabalhos mostram que uma dose única conhecida de UVB pode induzir uma ativação melanocítica transitória, com alterações morfológicas e histológicas em nevos melanocíticos, por vezes simulando melanomas iniciais. Entretanto, o mecanismo exato de formação dos melanomas ainda não está totalmente compreendido (5,9-13).

As metaloproteinases da matriz-2 e -9 (MMP-2, MMP-9), também chamadas, respectivamente, de gelatinases A e B, fazem parte de um grupo de enzimas responsáveis pela reestruturação dos tecidos normal e patológico. Atuam degradando os colágenos desnaturado (gelatina) e o tipo IV e, com isso, participando da morfogênese, cicatrização, reprodução, imunidade e angiogênese (14,15). Nas lesões melanocíticas, a expressão de MMP-2 e MMP-9 é bem documentada em melanomas, cuja invasão e

crescimento tumorais essas enzimas facilitariam através da degradação do colágeno e estimulando neoangiogênese (16,17). No entanto, lesões benignas, como nevos melanocíticos adquiridos comuns, nevos atípicos, nevos azuis ou nevos congênitos gigantes não costumam apresentar ou exibem escassa positividade dessas enzimas (17-19).

As gelatinases têm aumento de expressão na pele humana normal, após irradiação com ultravioleta B, expressando-se principalmente em fibroblastos dérmicos (20,21). Krengel *et al* observaram a expressão da MMP-2 em nevos irradiados com UVB em queratinócitos basais lesionais, porém não, em células névicas (12). Faltam estudos que investiguem a expressão da MMP-9 nas diversas estruturas histológicas de nevos irradiados com UVB.

A avaliação dos mecanismos fisiopatológicas, que ocorrem durante a exposição ultravioleta em nevos melanocíticos, é uma das maneiras de fundamentar o melhor entendimento da relação, já bem estabelecida em estudos anteriores, entre essa radiação e o surgimento de melanomas.

O objetivo do presente estudo é colaborar com os conhecimentos já existentes sobre os efeitos que a radiação ultravioleta B acarreta em nevos melanocíticos, nas suas distintas linhagens celulares. Assim, seu propósito é observar a expressão das gelatinases nestas lesões, comparando o lado irradiado com o lado não irradiado e tentar, com isso, trazer alguma contribuição para o entendimento dos aspectos envolvidos na transformação de lesões melanocíticas benignas em melanomas. Essa expressão das gelatinases em nevos melanócitos irradiados poderia demonstrar que a ação exercida pela radiação UV em células melanocíticas benignas seria capaz de desencadear um processo proliferativo e de neoangiogênese, semelhante ao das neoplasias malignas.



## 7. REVISÃO DA LITERATURA

### 7.1. Nevos melanocíticos

#### *Definição*

O conceito da palavra *nevo* é ainda, por vezes, tema de debate. A dificuldade em se ter uma definição mais precisa deve-se ao fato de ela ser utilizada para lesões tanto neoplásicas, como não-neoplásicas, congênicas ou adquiridas, assim como hereditárias ou não. São definidos como acúmulos de células provenientes de malformações, sendo que alguns destes são conceituados como “...uma malformação a partir de uma espécie de mosaicismo genético” (1,22). Os nevos melanocíticos são lesões originárias dos melanócitos, células provenientes da crista neural, possuindo funções especializadas (23).

#### *Aspectos epidemiológicos*

Estudos epidemiológicos realizados em países escandinavos, Reino Unido e Estados Unidos demonstram que nevos melanocíticos estão presentes em 0,2 a 3% dos recém-nascidos (24-28). Na maioria dos pacientes, têm um grande aumento, em termos de quantidade, durante a infância e adolescência até a terceira década de vida. A partir daí, seu surgimento parece estacionar, inclusive, com uma tendência à involução na terceira idade (7,29-31).

O crescimento do número de nevos, já na infância, é demonstrado por um estudo australiano que avaliou a prevalência de nevos melanocíticos, por faixa etária, em 193 crianças pequenas. Aquelas com idade entre 12 a 17 meses de vida apresentavam mais de um nevo em 54% dos casos, porém nenhuma evidenciava mais do que dez. Esse percentual vai aumentando de acordo com a idade. Assim, verificaram-se mais de 10

nevus em: 6% dos casos entre 18 e 23 meses; 8% dos casos entre 24 e 29 meses; 34% dos casos entre 30 e 35 meses; 55% dos casos entre 36 e 41 meses, e em 68% das crianças com mais de 42 meses (32). Ainda sobre a presença de nevus na infância, Wiecker *et al* ao estudarem 1812 crianças na Alemanha, encontraram um crescimento em relação ao número de nevus com a idade, com uma média de 3 lesões aos 2 anos, chegando à média de 19 com 7 anos de vida ( $P < 0.0001$ ) (33).

Em relação ao aumento de nevus durante a puberdade e adolescência, Darlington e colaboradores realizaram um estudo longitudinal com 111 crianças entre 12 e 13 anos e encontraram uma densidade de 130,1 nevus/m<sup>2</sup> na média da população estudada. Após um período de 5 anos, nova contagem evidenciou uma densidade de 215,5 nevus/ m<sup>2</sup> na mesma população (34).

A prevalência de nevus, nas distintas faixas etárias, foi avaliada em um estudo britânico realizado por Mackie e colaboradores. Os autores examinaram o número de nevus em um grupo de pacientes entre 4 dias e 96 anos de idade. Encontraram um aumento progressivo no número de nevus na infância e adolescência até a terceira década de vida. Dos 30 aos 80 anos, observou-se um leve declínio na quantidade e, a partir daí, uma queda que atingia níveis semelhantes aos encontrados na fase pré-puberal (29).

### *Classificação*

Os nevus melanocíticos podem ser divididos em congênitos ou adquiridos. Os congênitos, por definição, são aqueles presentes desde o nascimento. Eventualmente, podem surgir nevus com aspectos clínicos e histológicos indistinguíveis dos nevus congênitos desde o primeiro mês até o segundo ano de vida e que, dessa forma, são considerados como tal (28,35,36). São subdivididos, obedecendo a critérios aleatórios, de acordo com seu tamanho. Assim, são chamados de pequenos, aqueles menores do que

1,5 cm; de médios, os maiores ou iguais a 1,5 cm e menores ou iguais a 20cm; e de gigantes, os que medirem mais do que 20 cm (1,37,38).

Os nevos melanocíticos adquiridos (NMA) são subdivididos de acordo com suas características histo-patológicas. São chamados de juncionais (NMJ) quando há ninhos de melanócitos presentes somente na junção dermo-epidérmica; intradérmicos (NMI) quando há ninhos somente no derma, e de compostos (NMC) quando se apresentarem células névicas na junção e na camada dérmica (39,40).

#### *Fatores etiológicos*

Os fatores genéticos têm papel fundamental na origem dos nevos melanocíticos, tanto congênitos como adquiridos (4,7,41,42). Distintos trabalhos demonstraram a prevalência aumentada de nevos melanocíticos em membros da mesma família (4,39,41,43).

Wachsmuth e colaboradores estudaram a densidade de nevos melanocíticos em um grupo de 221 pares de gêmeos com idades entre 10 e 18 anos no Reino Unido. Encontraram um aumento da densidade em gêmeos monozigóticos em relação aos dizigóticos controlando para idade e exposição solar. Trabalho semelhante foi realizado por Zhu *et al*, na Austrália, com achados similares (42,43).

Um estudo alemão analisou 1812 crianças e seus pais com relação a fatores independentes de risco para desenvolvimento de nevos melanocíticos nas crianças. Os autores encontraram uma associação entre o maior número de nevos nas crianças e em seus pais, achado que sugere o caráter hereditário dos nevos (33).

Apesar da relação entre a herança genética e o surgimento de nevos estar bem exemplificada na literatura, ainda não se identificou um gene diretamente associado a eles (44). Entretanto, algumas mutações já foram encontradas em nevos. Kumar *et al* observaram que os genes NRAS e BRAF apresentavam mutações em 81% dos nevos

investigados, números semelhantes aos encontrados por Saldanha e colaboradores em 22 nevos (45,46). Estudos com genes CDKN2A e CDK4, presentes em muitos casos de melanoma familiar, mostram resultados conflitantes em relação à sua participação na gênese dos nevos (41,45-49). A participação de proto-oncogenes, como o c-met, encontrado em diversos tecidos embrionários, também foi sugerida (50).

Características pigmentares, tais como a pele clara, cabelos e olhos claros, maior tendência em desenvolver efélides e maior propensão a queimaduras solares, parecem também ser marcadores de risco para o desenvolvimento de nevos melanocíticos (4,32,51). Um estudo, com 913 crianças canadenses, demonstrou que aquelas que tinham pele mais clara, mais facilidade para se queimar e propensão para desenvolver efélides, tinham um maior número de nevos (52). Carli *et al* estudaram 3127 crianças e encontraram uma contagem maior de nevos naquelas de cor mais clara, cabelos louros e olhos azuis (53). Quinhentas e vinte e quatro crianças suecas, estudadas por Synnerstad e colaboradores, também mostraram que pele e olhos claros são marcadores de risco para desenvolver nevos (30).

A radiação ultravioleta tem sido considerada como o principal fator de risco ambiental relacionado ao surgimento de nevos melanocíticos adquiridos (4,7,30-32,54-57). Experimento com modelo animal de nevos melanocíticos humanos mostrou que o UVB está mais associado ao surgimento de nevos do que o UVA, a luz visível e todos esses espectros reunidos (58). Ainda, estudos indicam que a exposição à RUV antes dos 20 anos de idade é determinante para o surgimento dos nevos melanocíticos (4,55,56). Dessa forma, crianças que vivem em regiões de clima tropical parecem estar mais suscetíveis a ter mais nevos (4,54).

O padrão sazonal ou intermitente de exposição ao sol tem importante papel no aparecimento de novos nevos. Isto ocorre quando pessoas passam grande parte do ano sem se expor ao sol e, durante os meses mais quentes, abusam da fotoexposição,

apresentando queimaduras. Estudos já detectaram a importância das queimaduras solares na infância e da exposição ao sol durante as férias para o surgimento de nevos (52,54-56). Wiecker *et al* demonstraram que atividades de lazer ao ar livre e maior tempo de exposição ao sol nas férias estavam associados a maior densidade de nevos em crianças (33).

Wachsmuth *et al*, que estudaram a participação da herança genética na etiologia dos nevos melanocíticos em gêmeos, avaliaram, utilizando os mesmos pacientes, o efeito da radiação ultravioleta, observando que a densidade de nevos era maior naqueles indivíduos que se expunham mais ao sol no seu tempo de lazer (44).

A afirmativa de que o uso de filtros solares previna ou reduza o surgimento de nevos melanocíticos permanece controversa. Alguns trabalhos apontam os filtros solares como capazes de diminuir o surgimento de nevos (7,32). Em um ensaio clínico randomizado, Gallagher *et al* analisaram 309 crianças por 3 anos e encontraram um fator protetor para desenvolvimento de nevos no grupo de crianças alocado para utilizar filtros solares (média de nevos: 24 x 28;  $p=0,048$ ) (7). Entretanto, outros estudos não foram capazes de detectar esse efeito. Provavelmente, isso se deva ao fato de os indivíduos que utilizam filtros em maior quantidade, acabarem intensificando sua exposição frente ao sol (44,59,60).

#### *Patogênese dos nevos melanocíticos*

Como já foi antes comentado, as células névicas parecem ter origem dos melanoblastos da crista neural (39). Entretanto, o mecanismo completo pelo qual os nevos melanocíticos são formados ainda não está bem elucidado (40). Segundo Unna, em trabalhos datados do final do século XIX, os nevos melanocíticos originar-se-iam de melanócitos epidérmicos que migrariam em direção à derme até atingir suas proporções finais, processo chamado de *abtropfung* (61). Um trabalho que corrobora esta teoria é o

de Riley. Segundo ele, os melanócitos, quando em contato constante com células aceptoras eficazes em fagocitar seus melanossomas, como os queratinócitos, diminuem sua reprodução, ao passo que nevomelanócitos, desprendidos no derma superior, teriam uma capacidade reprodutiva maior (62). Outro achado que reafirma o caráter descendente das células névicas, parte da constatação da presença de componentes de zona da membrana basal, ricos em lamininas, integrinas e colágeno IV, encontrados em células ou ninhos névicos em diversas alturas da pele (63).

As células névicas parecem sofrer um processo de maturação desde a epiderme, encontrando-se na camada superior células cuboidais de citoplasma grande e diversos grânulos de melanina (epitelióides ou tipo "A"), com funções e morfologia semelhantes aos melanócitos epidérmicos. No derma médio, diminuem de tamanho, possuem citoplasmas menores e menos melanossomas (células tipo "B"); finalmente, as células tipo "C" encontram-se no derma profundo, são fusiformes e não costumam apresentar grânulos de melanina, o que lhes confere um aspecto neuróide (40,64).

Segundo essa teoria, a expectativa seria de que quanto mais jovens os pacientes, mais superficiais seriam os nevos encontrados. Entretanto, Worret *et al* estudaram 3534 nevos e verificaram que crianças abaixo de 10 anos não possuíam nenhum nevo puramente juncional, mas sim 52% de nevos compostos e 48% de intradérmicos. Em idosos, encontraram 12% de nevos juncionais, 23% de compostos e 65% de dérmicos (65).

É postulado por autores que as células névicas possam ter duas origens. Os nevos melanocíticos com formação de ninhos juncionais ou de derma superior seriam originários de melanócitos epidérmicos, enquanto os nevos mais profundos adviriam de células neurais, que não melanócitos, possivelmente de células de Schwann. Estudos com imunistoquímica mostram características fenotípicas de células de Schwann em células névicas tipo "c" (64,66).

### *Características Clínicas*

Os nevos melanocíticos congênitos pequenos e médios costumam apresentar formas arredondadas ou ovais, sendo lesões hiperocrômicas que, inicialmente, podem ser manchas, evoluindo mais tarde para a formação de pápulas, nódulos ou placas (39). Pêlos podem ou não estar presentes. Na puberdade, são comuns o aumento de pêlos e o escurecimento das lesões (1). Seu tamanho é variável e determinante na classificação, como já foi referido anteriormente. A superfície pode ser lisa ou rugosa, por vezes, adquirindo aspecto verrucoso (39). A diferenciação em relação aos nevos melanocíticos adquiridos, nos casos em que a época de surgimento das lesões for incerta, pode ser muito difícil, muito embora os nevos congênitos possuam tendência a serem maiores (67).

Os nevos melanocíticos congênitos grandes ou gigantes possuem características clínicas semelhantes, porém com maiores proporções (39). É muito comum a presença de lesões satélites menores, circundando os nevos gigantes (68). Os pêlos estão presentes em quase todos os casos (39). Há uma associação importante entre a melanose leptomenígea e os nevos melanocíticos congênitos gigantes, principalmente quando esses se localizam no feixe dorsal axial e quando um grande número de lesões satélites está presente (39,50,69).

Os nevos melanocíticos adquiridos são definidos clinicamente de acordo com seu tamanho, cor, simetria e bordas (3). Costumam ser lesões simétricas, com bordas regulares e superfície elevada ou plana. Sua coloração é homoganeamente distribuída, variando em tons de marrom. A definição de nevos adquiridos, na maioria dos estudos que os avaliam, determina o seu tamanho num diâmetro que seja maior ou igual a 2mm e menor ou igual a 10mm e que apresentem as características descritas (3,4,8,30,31,37,44,52,57,70-73).

Levando em consideração os subtipos histo-patológicos, os nevos com componente exclusivamente juncional costumam se apresentar como máculas ou manchas marrom-escuras, sendo que os compostos se apresentam em tons de marrom mais claros que os juncionais e com aspecto papuloso. Os nevos intradérmicos freqüentemente se caracterizam como pápulas ou nódulos da cor da pele, eventualmente formando lesões pedunculadas ou sésseis nas axilas, coxas e pescoço (1).

#### *Outros nevos melanocíticos*

O estudo dos nevos melanocíticos envolve o conhecimento dos distintos subtipos clínico-patológicos existentes. Passa-se a comentar, a seguir, alguns aspectos gerais das principais entidades pertencentes a esse diagnóstico diferencial, apontando suas características clínicas primordiais.

##### - Nevos displásicos:

Os nevos displásicos são também chamados de nevos de Clark ou atípicos. Estudos de prevalência mostram que eles estão presentes em 5-18% dos pacientes das amostras estudadas (37,74). Clinicamente, são lesões que costumam medir acima de 5mm de diâmetro, apresentam certa assimetria, bordas irregulares; são planos, porém com centro papuloso em certos casos (75). A coloração costuma ser mais heterogênea do que a dos nevos melanocíticos adquiridos (1,37,39). Podem ocorrer esporadicamente ou por herança familiar. Queimaduras solares antes dos 20 anos de vida estão associadas ao seu surgimento nas formas esporádicas (55). Podem formar a chamada síndrome B-K, que leva as iniciais das duas famílias que foram inicialmente estudadas (76). A síndrome consiste na presença de 100 ou mais nevos, sendo que pelo menos um nevo é maior ou igual a 8 mm de diâmetro e pelo menos um é, clinicamente, considerado atípico (74). Pela falta de critérios clínico-patológicos precisos para o diagnóstico do nevo displásico e da síndrome dos sinais B-K, nem sempre, essas entidades são aceitas (77).



- Nevo de Spitz:

Antes denominado de melanoma juvenil, esse é um tipo de nevo composto com características clínico-patológicas peculiares (78), sendo também denominado de nevo de células fusiformes e ou de células epitelióides (1,75). Costuma ser diagnosticado na infância e adolescência, representando aproximadamente 1% dos nevos excisados em crianças (39). Clinicamente, apresenta-se, habitualmente como uma pápula ou nódulo, único, circunscrito, simétrico e em coloração rósea ou marrom clara (79,80). Em geral, essa espécie de nevo mede menos do que 1 cm de diâmetro (80). O diagnóstico diferencial em relação ao melanoma muitas vezes é difícil. Face, pescoço e extremidades são suas localizações mais comuns (80). Os nevos de Reed correspondem a uma variante pigmentada do nevo de Spitz (1).

- Nevo halo:

São também chamados de nevos de Sutton ou *leukoderma acquisitum centrifugum*. Os nevos melanocíticos, em geral, podem apresentar esse fenômeno que ocorre quando aparecem circundados por um halo de despigmentação que leva à absorção e regressão do nevo central (81). A mancha hipo ou acrômica persiste por alguns anos e tende a repigmentar mais tarde (1), podendo apresentar-se de forma isolada ou múltipla. Sua ocorrência é mais comum em crianças e adolescentes (75). Apesar de sua presença poder estar associada ao vitiligo, há indicações de que correspondam a duas doenças distintas. Estudos com HLA e biologia molecular demonstraram diferenças na patogênese do vitiligo e dos nevos halo. O mecanismo pelo qual o fenômeno ocorre não é totalmente compreendido, porém parece se tratar de uma reação auto-imunológica contra células névicas e que, em alguns casos, poderia ter os melanocíticos da pele como epítomos à distância, o que geraria o vitiligo (82,83). Um infiltrado de linfócitos ativados, na maioria citotóxicos, está presente no estudo

anatomopatológico e, inclusive, no sangue periférico (84). A diferenciação, com o halo melanoma, é a principal questão (85).

- Nevo azul:

Os nevos azuis são lesões pigmentadas pouco freqüentes, constituídas por acúmulos de melanócitos, capazes de produzir melanina, e que ficaram retidos na derme no decorrer da migração da crista neural para a pele, durante o período embrionário (86). Devido ao efeito Tyndall, apresentam-se sob cor azul-acinzentada que lhe é característica (39,87). Consistem em pápulas ou nódulos firmes, isolados, simétricos, cupuliformes, com 0,5 a 1,0cm de diâmetro (88). A face, as nádegas e o dorso de mãos e pés são as áreas mais acometidas (1).

- Nevo combinado:

São lesões que possuem dois tipos de nevo, conjugados, identificáveis no estudo anatomopatológico (89,90); usualmente, nevos azuis associados a outros. Clinicamente, essa sobreposição confere irregularidades às bordas dos nevos, lesões maiores, com heterogenicidade de cores em grande parte dos casos. Por isso, muitas vezes, seu diagnóstico é difícil, mesmo na histopatologia (89).

- Nevo salpicado:

Tipo pouco comum de nevo que consiste em uma mancha hiperocrômica, medindo de 1 a 6 cm de diâmetro, com pequenas pápulas ou máculas salpicadas e mais escuras que a mancha circundante (1,39,91). Costuma ser adquirido, surgindo ainda na infância (67,92). Lesões maiores ou zosteriformes podem ocorrer (91).

## **7.2. Melanoma**

A incidência do melanoma cutâneo vem aumentando na população branca em todo o mundo, nas últimas décadas (31,72,93-105). Segue-se a isso, porém em menor escala, um aumento na mortalidade (99,106). Entretanto, a taxa de sobrevida geral em 5

anos tem melhorado. Isso se deve ao fato de o diagnóstico estar sendo feito de maneira mais precoce (3,93). Instalações de sistema de registro compulsório de casos novos e de programas de controle e prevenção da doença são fundamentais para um melhor entendimento e manejo do melanoma (106-108).

A incidência de melanoma no Brasil também vem aumentando (109). Entretanto, faltam, em nosso meio, formas de aferição mais precisas sobre sua taxa real de ocorrência (110). A estimativa do INCA para 2005 é de que tenhamos 5820 casos novos de melanoma, diagnosticados no Brasil. Aponta-se para a região sul uma incidência de 8,59 casos novos /100.000 habitantes/ano e 9,66 casos novos/ 100.000 habitantes/ano, respectivamente em homens e mulheres, as maiores do país (111).

No restante da América do Sul, pouco se conhece, também, em relação à incidência real do melanoma. Um estudo epidemiológico realizado no extremo sul chileno, na cidade de Punta Arenas (53°S ), observou um aumento na incidência de 1,1 para 1,9 casos por 100000 habitantes nas últimas décadas, associado à diminuição da camada de ozônio antártica (98), também um aumento da mortalidade pelo melanoma ficou evidenciado naquele país (112). Na Argentina, dados da década de 90, mostram uma mortalidade em homens e mulheres de, respectivamente, 0,7 e 0,4/100000 habitantes (73).

Em países desenvolvidos, os dados em relação à incidência e mortalidade por melanoma são mais precisos. Na Austrália, país com a maior incidência de melanoma no mundo, observa-se um aumento na incidência nos sexos masculino e feminino de, respectivamente, 22 % e 12%, nos últimos 10 anos (93). Na Nova Zelândia, dados recentes evidenciam um aumento de sua incidência na população branca, passando de 6,2/100000 em homens e de 9,1/100000 em mulheres no período entre 1962-66 para 36,5/100000 e 33,2/100000, respectivamente, entre 1995-9, o que faz desse país a segunda maior incidência mundial da doença (100). Dados do CDC em Atlanta mostram

que, nos Estados Unidos, houve um aumento na incidência geral em 120,5% (6,5 para 14,0/100000) nos últimos 30 anos na população branca. Entretanto, o aumento da incidência de 1994-9 foi menor do que no período 1973-7, sugerindo que talvez se esteja atingindo um platô (99).

Em países europeus, diversos trabalhos confirmam o aumento na incidência do melanoma. No Reino Unido, observou-se um aumento progressivo da incidência dos melanomas em todas as faixas etárias nos últimos 30 anos. A taxa geral gira em torno de 8 casos por 100000 habitantes (105). Um grande levantamento sobre a incidência de câncer na França registrou um aumento de 5% ao ano nos casos de melanoma, nos últimos 20 anos (113). Um outro levantamento espanhol mostra que a incidência do melanoma nesta população entre 1993 e 1996 foi de 2,4 em homens e de 4,99/100000 (114). Dados aferidos nas regiões de Vaud e Neuchatel, na Suíça, demonstram um aumento sensível da doença nos últimos anos, passando de 5,7 e 7,9 casos /100000 habitantes em homens e mulheres em 1978, para 16,8 e 18,7/100000, em 2002, respectivamente (102).

Este aumento na incidência de melanomas atinge também as faixas etárias mais baixas. Na Suécia, foi detectado um aumento de sua incidência em menores de 20 anos na última década (30). De Vries e colaboradores estimam, considerando esse crescente aumento na incidência de melanomas na população branca, que o número de casos anual deva dobrar nos próximos 10 anos, passando a 4800 novos registros por ano na Holanda (115).

Mas esse crescimento na incidência de melanomas na população branca não se verifica em pessoas de fototipo mais escuro. Koh e colaboradores, ao avaliarem a ocorrência de melanomas nos últimos 30 anos, em Cingapura, observaram que a incidência de melanomas permaneceu constante na população constituída de indivíduos de fototipo igual ou maior que III, em sua maioria (116). Estudos com hispânicos, que

também costumam ter fototipos mais altos, confirmam a menor incidência de melanomas nessa população em relação aos caucasianos (117,118). Segundo Nair e colaboradores, a incidência na Índia é de 0,5 casos/100000 por ano (119). Em um hospital da Arábia Saudita, somente 2 casos de melanoma foram diagnosticados durante um período de 20 anos, em mais de 70000 atendimentos (120). Em pacientes de fototipo mais escuro, além do melanoma ser menos incidente, o tipo que predomina é o acrolentiginoso que, ao contrário do padrão encontrado nos caucasianos, não costuma estar relacionado à radiação ultravioleta e ao número de nevos presentes nos pacientes (121,122).

Fatores de risco constitucionais e ambientais estão associados ao aparecimento dos melanomas. A pele com fototipos mais claros, a presença quantitativa (mais de 50 nevos adquiridos) e qualitativa (presença de nevos atípicos) de nevos e a história familiar de melanoma são os principais fatores constitucionais para o seu surgimento (34,93,96,106,123,124).

A radiação ultravioleta é considerada o principal fator de risco ambiental na gênese do melanoma, a exemplo do que foi descrito com nevos melanocíticos (7,8,30,53,55,56,93,95-97,106). A exposição solar intermitente, sob forma de queimaduras, principalmente na infância, é o comportamento mais associado à doença nos estudos epidemiológicos (106). Em nosso meio, Bakos e colaboradores observaram, em um estudo de casos e controles com pacientes com melanoma, que as queimaduras foram o principal fator de risco no desenvolvimento da doença, com uma razão de chances de 11,4 (IC 95% 2,6-50,5) (8).

Isso serve tanto para os casos de melanoma tipo espalhamento superficial, que é a forma mais comum em pacientes constitucionalmente predispostos, como para o tipo nodular. O lentigo maligno, comum em idosos, parece estar mais relacionado a um padrão crônico de fotoexposição (106,125). O fato de os membros inferiores em mulheres e do tronco em homens, áreas costumeiramente mais fotoprotégidas ao longo do ano,

serem as mais acometidas pelo melanoma de espalhamento superficial sugere que este risco está associado à exposição sazonal ao sol, principalmente em tempo de lazer (97).

### **7.3. Associação de nevos e melanoma**

As relações entre os melanomas e nevos melanocíticos permanecem em debate, principalmente devido à necessidade em se conhecerem melhor seus aspectos histogênicos (126). A maioria dos melanomas, em torno de 70% dos casos, surge da pele normal. A outra parcela encontra-se associada aos nevos e determina sua importância como precursores (94). Kaddu et al estudaram 667 exames histopatológicos de melanomas e encontraram 22% associados a estruturas névicas. Observaram, também, que os melanomas associados histologicamente a nevos tinham espessuras menores e melhor sobrevida. Isso possivelmente se explique pelo fato de que lesões malignas, quando associadas a lesões de características clínicas benignas, sejam identificáveis de maneira mais precoce (126). Tsao e colaboradores estimam que a chance anual de conversão de cada nevo em melanoma é pequena (0,0005%) para pessoas com menos de 40 anos, porém aumenta, principalmente após os 60 anos de vida (94). Além de precursores, os nevos melanocíticos podem também ser importantes marcadores de risco para melanoma. A relação dos principais tipos de nevos, com o melanoma, será mostrada a seguir.

#### *Associação com nevos congênitos*

Já é sabido que a presença de nevos melanocíticos congênitos grandes implica um maior risco de desenvolvimento do melanoma (28,127,128). Estima-se que essa associação ocorra em 2,9 a 20% dos casos (129,130). Os melanomas costumam surgir precocemente, acometendo, em geral, crianças abaixo de 10 anos de vida (28). O nevo

gigante é o sítio principal de seu surgimento, embora possa ocorrer também em outros locais extra-cutâneos como as leptomeninges (130).

Egan *et al* acompanharam 46 crianças com nevos gigantes por um período de aproximadamente 7 anos e observaram 2 pacientes apresentando 3 melanomas, todos originados nos nevos (130). Hale *et al* diagnosticaram 10 casos de melanoma em 205 crianças com nevos congênitos grandes e encontraram uma associação positiva na relação entre o tamanho do nevo e o surgimento da neoplasia (131). Uma revisão de melanoma na infância e adolescência foi realizada de 1980 a 2000 no Hospital do Câncer de São Paulo e encontrou 32 casos, 5 deles associados a nevos melanocíticos congênitos gigantes (132).

O risco de nevos congênitos médios e pequenos serem precursores de melanoma permanece incerto (24). É sugerido que esta relação exista, porém que seja menor do que aquela atribuída aos nevos congênitos grandes (37,128). A literatura carece de estudos longitudinais com pacientes portadores desses nevos e seguimentos a longo prazo. Sahin *et al* acompanharam por um tempo médio de 5,8 anos, 227 pacientes com 230 nevos congênitos médios, mas não encontraram nenhum caso de melanoma (133).

Em 1992, Rhodes publicou os resultados de seu trabalho com 234 melanomas, em que encontrou restos histológicos de nevos congênitos pequenos em 8,1% (19/234) dos casos. Os critérios para a definição dos nevos como congênitos foram a presença de células névicas entre as fibras colágenas dos 2/3 inferiores do derma reticular e/ou das células em um ou mais anexos cutâneos (foliculos, glândulas sebáceas, músculo eretor do pêlo e ductos écrinos) (134). Maia *et al* encontraram, em amostra de 204 melanomas, 44 associados a nevos (21%). Diferentemente de em Rhodes *et al*, nesse estudo, os nevos foram classificados como congênitos, a partir de informações clínicas daqueles que afirmavam taxativamente que a “pinta” existia desde o nascimento (123). Berg e Lindelöf na Suécia acompanharam pacientes com 1058 nevos melanocíticos congênitos, dentre os

quais 93% eram pequenos. Após um seguimento de mais de 15 anos, não encontraram nenhum melanoma nesses pacientes (24).

#### *Associação com nevos adquiridos*

Os nevos adquiridos podem ser identificados como precursores de melanoma (94,126); entretanto, estudos mostraram sua importância também como marcadores de risco (3,4,135). Um dos primeiros estudos de caso-controle que avaliou a associação da contagem de nevos ao risco de melanoma, foi realizado por Holly *et al* em 1984. Segundo seu relato, a presença de mais de 50 nevos melanocíticos adquiridos foi considerada o principal fator de risco (3). Desde então, trabalhos com população branca em diversos países apontam o número excessivo de nevos melanocíticos adquiridos como um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de melanoma (4,53,55-57,71,73,96,136). Como 80% dos pacientes com melanoma costumam apresentar mais de 50 nevos, esse parece ser o número mais sugestivo para estabelecer um aumento de risco (37). Garbe *et al* estudaram 513 pacientes com melanoma e 498 controles, havendo encontrado um risco relativo de 7,6 em pacientes com mais de 100 nevos em relação aos que possuíam menos que 10 (96). Rodenas e colaboradores encontraram, em pacientes com melanoma, maiores contagens gerais de nevos, inclusive no sítio de surgimento da neoplasia, embora outros autores não concordem com este último achado (4,71). Uma metanálise de 26 artigos que avaliaram número de nevos como fator de risco para melanoma, indicou um risco relativo de 6,89 (IC95% 4,63- 10,25) para aqueles com mais de 100 nevos em relação aos com menos de 15 (136).

Os melanomas de espalhamento superficial e nodular são os tipos clínico-patológicos mais associados a contagens aumentadas de nevos, já que tanto no caso de nevos melanocíticos, como nesses tipos de melanoma, seu surgimento está significativamente associado às queimaduras solares na infância (4). Rokuhara *et al*



realizaram estudo com pacientes portadores de melanomas e controles na população japonesa. Detectaram, nessa população asiática, a associação entre número aumentado de nevos e melanomas de espalhamento superficial e nodular, porém não com melanomas acrais (31).

#### *Associação com nevos displásicos*

Os nevos displásicos podem ser considerados marcadores de risco e precursores de melanomas (4,37). Kaddu e colaboradores observaram a sua importância como precursores, quando revisaram 148 melanomas associados a nevos no exame histopatológico, e encontraram seus restos em 80 casos (126).

Diversos estudos comprovam a associação dos nevos displásicos como marcadores de risco para melanoma; entretanto, a maioria deles leva em consideração o diagnóstico clínico do nevo, sem estabelecer a correlação histológica (74). Em um estudo caso-controle, Tucker et al, examinaram 716 casos de melanoma e 1014 controles. A presença de 1 nevo displásico indicava um risco de duas vezes, enquanto a presença de mais de 10 nevos atípicos implicava um risco doze vezes maior que em pacientes sem a presença dos nevos (137). Outro estudo caso-controle multicêntrico, realizado na Alemanha, registrou a presença de mais de 5 nevos displásicos como um fator de risco independente para o surgimento do melanoma, com um risco relativo ajustado de 6,1 (96). Bataille *et al* revisaram os fatores de risco para casos de melanoma na população branca australiana e britânica. Observaram, em ambas, o aumento de risco em portadores de mais de 3 nevos displásicos. Na população australiana, os nevos displásicos eram mais prevalentes, sugerindo a ação mais intensa da radiação ultravioleta na gênese desses nevos e dos melanomas em pessoas de pele clara, que vivem em países com clima tropical (57). Gandini *et al* encontraram em sua metanálise um risco

relativo de 6,36 (IC95% 3,80 – 10,33) para aqueles que tinham mais de 5 nevos atípicos (136).

Pacientes que apresentam nevos displásicos de caráter familiar, exemplificado na síndrome dos nevos displásicos, têm também um risco significativo de desenvolver melanomas (4).

#### **7.4. Radiação ultravioleta**

##### *Conceitos fundamentais*

O sol é a maior fonte de radiação ultravioleta (RUV) que interage com o ser humano. A RUV faz parte do chamado espectro eletromagnético e compreende a faixa de comprimento de onda entre 200 e 400nm (138). É classificada, de acordo com seu comprimento de onda, em UVA1 (340-400nm), UVA2 (320-340nm), UVB (290-320nm) e UVC (200-290nm). A radiação ultravioleta abaixo de 290 nm é toda filtrada na atmosfera pela camada de ozônio e oxigênio, assim como grande parte da faixa de UVB (138,139). A UVA representa mais de 95% da radiação ultravioleta na superfície terrestre, sofrendo pequena variabilidade durante o dia. A UVB é mais incidente quando o sol se encontra perpendicular à Terra, próximo ao meio-dia, diminuindo nas duas extremidades do dia. Mesmo assim, é responsável por somente 5% da radiação ultravioleta nesse horário (140).

A penetrabilidade da RUV na pele depende do comprimento de onda, da reflectância e de reações fotoquímicas. Para ocorrer uma reação fotoquímica é necessário, basicamente, que um fóton seja absorvido por um cromóforo. Na pele, a radiação ultravioleta atua como um fóton, podendo ser refletida ou absorvida por cromóforos. A radiação ultravioleta B penetra até o derma superior, pois seus principais cromóforos (DNA, RNA, tirosina, triptofano, melanina) situam-se até essa profundidade. A

UVA tem comprimento de onda maior, é menos absorvida por cromóforos epidérmicos, penetrando até o derma médio (140,141). Os efeitos da RUV na pele podem ser agudos como as queimaduras solares e as mudanças na imunidade cutânea; e crônicos, principalmente, o fotoenvelhecimento e a fotocarcinogênese (142).

### *Efeitos agudos*

Os efeitos agudos da radiação ultravioleta são, em sua maior parte, prejudiciais à pele, causando, inclusive, respostas adaptativas. São eles as queimaduras solares, o estímulo à melanogênese (bronzado) e a imunossupressão. O estímulo à síntese da vitamina D é uma exceção (143).

A primeira reação inflamatória na pele, secundária à radiação ultravioleta, é a vasodilatação. O eritema consequente dessa vasodilatação é bifásico. O eritema inicial que surge logo após a exposição, é seguido de um eritema mais potente, que começa na primeira hora após a fotoexposição e pode aumentar até 24-48 horas mais tarde. Dependendo da intensidade, as queimaduras podem ser acompanhadas de edema e, inclusive, de bolhas. Este efeito está mais relacionado com o UVB, considerado o espectro eritematogênico da radiação ultravioleta. O UVA expressa um eritema mais tardio (144).

Queimaduras por radiação ultravioleta, principalmente por UVB, são responsáveis por mudanças imunológicas na pele nos 10 dias seguintes à exposição (145), capazes de gerar um estado de imunossupressão local ou até sistêmico (146). Isso ocorre através de um mecanismo complexo. Sabe-se que a radiação ultravioleta é capaz de promover a alteração da quantidade e funcionalidade de linfócitos T (147,148); estimular a liberação de mediadores inflamatórios e citocinas (IL-10, IL-12) (149,150); diminuir a capacidade de apresentação de antígenos pela depleção de células de Langerhans (151,152), fazendo com que haja uma diminuição da imunidade celular (144). Tais alterações levam

a pele a ficar mais susceptível a infecções bacterianas e virais e a diminuir a *vigilância* quanto ao surgimento de neoplasias (140,144). Cestari e colaboradores exemplificaram essa modulação da resposta imune cutânea, demonstrando que, em pacientes Mitsuda positivos, os granulomas de leprominas ficavam reduzidos nas áreas irradiadas com RUV e passavam a conter menos linfócitos (147). Byrne *et al* observaram pela primeira vez, em modelos experimentais com animais, que a RUV pode, inclusive, alterar o funcionamento de linfócitos B. Sugerem que isto dificultaria a apresentação de antígenos e, conseqüentemente, reduziria linfócitos T ativados (146).

Pequenas doses de UVB são necessárias para estimular a síntese da vitamina D (153). A RUV é fundamental para a isomerização do 7-deidrocolesterol na pré-vitamina D, que então é convertida em 1,25 (OH)<sub>2</sub> vitamina D<sub>3</sub>, forma ativa do hormônio que é mais eficiente na absorção de cálcio (143).

A pele possui dois mecanismos de defesa principais aos danos da RUV: o espessamento epidérmico com hiperqueratose e o aumento de produção de melanina pelos melanócitos (143). Poucos minutos de exposição ao sol são necessários para estimular o bronzeado. Isto se dá através de um processo foto-oxidativo e de reorganização da melanina disponível, estimulados pelo UVA. O bronzeado tardio vem com o aumento da melanogênese através da tirosinase e a transferência da melanina produzida nos melanócitos pelos seus dendritos para os queratinócitos (140,143). É importante ressaltar que os melanócitos, dependendo do fenótipo pigmentar dos indivíduos (fototipos), variam na taxa de síntese de melanina, na capacidade de produzir eumelanina (pigmento marrom-preto) ou feomelanina (amarelo-vermelho) e na maneira de transferir os melanosomos para os queratinócitos. Tais variações determinam as distintas tonalidades de pele observadas no ser humano (143).

### *Efeitos crônicos*

Os principais efeitos crônicos da radiação ultravioleta são o fotoenvelhecimento ou fotodano e a participação no surgimento de neoplasias cutâneas (9,138).

O envelhecimento cutâneo, associado à exposição prolongada à radiação ultravioleta, caracteriza-se por rugas, atrofia cutânea, perda da elasticidade da pele e manchas hiper ou hipocrômicas precoces. Diferenças clínicas e histológicas ocorrem em relação ao envelhecimento biológico (154). Aqueles indivíduos, que utilizaram uma fotoproteção mais intensa, apresentaram sinais de envelhecimento concernentes com sua idade biológica. Inclusive, pessoas de pele mais escura possuem uma proteção natural que retarda esses sinais (155).

A fisiopatologia do envelhecimento cutâneo pelo dano actínico envolve um mecanismo celular complexo. Inicia com um processo fotoquímico entre cromóforos cutâneos e a RUV com liberação de radicais livres de oxigênio (156) e uma cascata de eventos, tais como: sinalização de citoquinas, maior expressão de receptores de superfície celular, fatores transcriptores e liberação de enzimas responsáveis pela degradação das estruturas que sustentam a pele (157).

A radiação ultravioleta A tem um papel importante nesse processo, pois penetra até níveis mais profundos do derma. O exame histopatológico de pacientes fotoenvelhecidos revela, principalmente, alterações do colágeno e depósitos de material elastótico dérmico (elastose solar) (9). Ainda a esse respeito, Berneburg *et al* encontraram, na pele de voluntários irradiados com doses sucessivas de UVA, mutações do DNA mitocondrial de fibroblastos associadas ao processo inicial do fotodano na derme (158). A ação do UVB também tem importância, no que se refere às alterações epidérmicas e de derma superficial (140).

Estudos epidemiológicos mostram que os efeitos mais relevantes, relacionados à RUV, envolvem a sua participação no surgimento de neoplasias cutâneas melanocíticas e queratinocíticas (125,159). Gandini e colaboradores realizaram uma metanálise dos dados obtidos nos principais sítios de busca na rede mundial de computadores, publicados até setembro de 2002, avaliando as relações entre radiação ultravioleta e melanoma. Encontraram 57 artigos passíveis de inclusão, dos quais 52 eram estudos caso-controle e 5 estudos de coorte. Foram avaliados 38671 casos de melanoma em 22 países. A exposição solar de modo intermitente e as queimaduras solares foram os fatores de maior risco relativo médio associado com o surgimento do melanoma (RR= 1,61 e 2,03, respectivamente), principalmente, em locais de maior latitude. Já a exposição solar ocupacional apresentou uma relação inversa (125).

A RUV promove o desenvolvimento de neoplasias cutâneas através de mutações gênicas e de imunossupressão. O UVB é o componente do espectro mais associado; o DNA atua como seu cromóforo, e, com a liberação de fotoprodutos e dímeros de pirimidina ciclobutano, ocorrem as mutações (160,161). UVB e UVA colaboram com esse dano, direta ou indiretamente, através do stress oxidativo, que libera fatores transcriptores como AP-1 (*activator protein-1* – proteína ativadora-1) e NFkB (*nuclear factor kappa B* – fator nuclear kappa B), colaboradores da proliferação celular (161).

O mecanismo básico, por meio do qual a carcinogênese ocorre, é uma expansão clonal que possui mutações por ativação de oncogenes e inativação de genes supressores tumorais (143,161). Os queratinócitos são dotados de meios de defesa eficientes, estimulados por uma cascata de eventos bioquímicos complexa, com vistas a evitar ou, ao menos, retardar a formação das neoplasias. Estimulados pela radiação ultravioleta, genes de supressão tumoral, como o p53, atuam na reparação do DNA celular danificado (160). Entretanto, aquelas células com danos irreparáveis sofrem apoptose (*sunburn cells*), estimuladas pelo próprio p53 e outros genes, como o GADD45

(160). Oito horas após uma queimadura solar, as *sunburn cells* já são detectáveis. Têm sua expressão máxima em 24-48h e desaparecem em 60-72 horas (162). Essa hipótese explicaria o fato de a exposição solar de modo intermitente estar menos implicada na gênese do carcinoma epidermóide. As células com mais mutações devido a queimaduras solares seriam, em seguida, destruídas. Já com doses repetidas e baixas de RUV (exposição crônica ou ocupacional), se esperaria que múltiplas mutações ocorressem e permanecessem expressadas na epiderme, aumentando a chance de, com o tempo e desgaste do mecanismo protetor, colaborar com o surgimento das neoplasias (163).

Os melanócitos, ao contrário dos queratinócitos, são células pouco proliferativas e representam 8–10% das células habitantes da epiderme. Daí, a importância em resguardar sua vida e integridade genotípica frente aos efeitos adversos da radiação ultravioleta (143). A transformação para melanoma também ocorre através da ativação de oncogenes e inativação de genes supressores tumorais. Os genes p53 e p16 são os principais responsáveis pela reparação do DNA dos melanócitos. Entretanto, por serem células pouco proliferativas, não entram em apoptose. O gene bcl-2, que é antiapoptótico, tem sua expressão aumentada em melanócitos em relação aos queratinócitos, sendo o principal responsável por essa característica (160), o que sugere uma maior tolerância por parte da natureza a pequenas mutações nos melanócitos de tal forma que se conserve a fotoproteção exercida pela produção de melanina (163). Algum desequilíbrio nessa homeostase genética, associado à existência de oncogenes, tais como mutações de CDKN2A, BRAF, ras e MC1R, permite o surgimento do melanoma (143).

As implicações desse modelo de transformação do melanócito, através da radiação ultravioleta, parecem ter repercussão na epidemiologia dos melanomas. Quando sofrem queimaduras solares, os melanócitos são estimulados a produzir melanina e, conseqüentemente, a partir desse momento aumentam a fotoproteção intrínseca da pele. Eles sofrem, também, danos substanciais no DNA e sobrevivem, sem realizar apoptose,

reparando ou não este dano (163). Se continuada a fotoexposição nesse período, as doses de RUV vão ser melhor toleradas pelos melanócitos, dada a fotoproteção adquirida (163,164). Entretanto, altas cargas de RUV, que clinicamente seriam representadas por novas queimaduras, podem acarretar um incremento de alterações do DNA e a sua transformação para melanoma (163).

#### *Estudos experimentais com nevos irradiados*

Irradiar nevos melanocíticos com doses conhecidas de radiação ultravioleta B tornou-se uma maneira interessante de estudar as mudanças morfológicas e bioquímicas de suas distintas linhagens celulares frente a essa radiação e examinar os possíveis mecanismos envolvidos na origem de melanomas, a partir de melanócitos em nevos.

Tronnier e colaboradores destacam-se por suas publicações nessa linha de pesquisa. Inicialmente, selecionaram 12 nevos melanocíticos com diâmetro > 5 mm sem sinais clínicos de atipia e/ou de malignidade e estabeleceram a dose eritematosa mínima de cada paciente. Cobriram com uma fita preta metade do nevo e irradiaram a outra metade com uma dose única de 2 DEM (dose eritematosa mínima). Uma semana após, a lesão era excisada. No exame histopatológico, observaram que o lado irradiado apresentava uma série de alterações morfológicas semelhantes a nevos atípicos e até a melanoma *in situ*. A presença de um número aumentado de melanócitos na camada suprabasal foi o achado mais relevante, porém raros atingiam a camada córnea. Os melanócitos apresentavam núcleos aumentados, menos basofílicos e citoplasma pálido; não obstante atipias celulares não foram observadas. A camada córnea encontrava-se espessada com paraceratose. Além disso, expressões aumentadas de HMB-45 demonstraram a formação ativa de melanossomos no lado irradiado (6).

No mesmo ano, Tronnier e colaboradores publicaram estudo no qual investigaram as mesmas alterações morfológicas em 13 pacientes usando metodologia semelhante ao



anterior. Entretanto, os nevos foram excisados em 1, 2 ou 3 semanas após a irradiação. Comprovaram que as alterações apresentadas no estudo anterior existiam após 1 semana, porém, quando excisadas após 2 ou 3 semanas, não se observavam mais diferenças entre o lado irradiado e o não-irradiado, demonstrando o caráter transitório dessas alterações (5).

Dois anos mais tarde, o mesmo grupo de pesquisadores investigou as diferenças morfológicas e imunoistoquímicas de nevos melanocíticos irradiados com a mesma metodologia, porém, em dois grupos distintos. No primeiro, 11 nevos melanocíticos foram irradiados com dose única de 2 ou 4 DEM; no segundo, 10 nevos receberam de 4 a 6 doses suberitematosas por uma semana. As lesões eram excisadas após uma semana para comparação dos lados irradiado e não-irradiado. Nos pacientes com irradiação única, observaram um aumento nas alterações morfológicas e na atividade de melanócitos, mas não constataram mudanças significativas naqueles tratados com doses suberitematosas. Esse achado demonstra a importância das queimaduras solares nas alterações de melanócitos (165).

Em nosso meio, Mariante estudou as alterações clínicas, dermatoscópicas, histopatológicas e imunoistoquímicas de nevos melanocíticos irradiados com raios ultravioletas B. A alteração mais encontrada na avaliação clínica dos lados irradiados foi um eritema perinévio. Na dermatoscopia, além do eritema, observou-se uma pigmentação mais evidente e bordas irregulares dos nevos. As alterações histopatológicas mais frequentes foram paraceratose, hiperplasia de melanócitos com aumento de núcleos e citoplasma, semelhantes às encontradas nos trabalhos de Tronnier e colaboradores. HMB-45 e S100 expressaram-se mais nos lados irradiados (13).

### **7.5. Matriz extracelular do derma**

A matriz extracelular é formada por um arranjo de macromoléculas biologicamente ativas que colaboram na sustentação e funções da derme, juntamente com as diferentes linhagens celulares nela existentes (fibroblastos, histiócitos, entre outras) (166). Estruturalmente, partem de uma substância amorfa, composta de polissacarídeos e proteínas que atraem e retêm água (proteoglicanas), entrelaçada com fibras de origem protéica, colágenas e elásticas e diversos outros componentes microfibrilares (167).

As proteoglicanas regulam uma série de processos biológicos, que vão, desde sinalização de fator de crescimento, atividades enzimáticas, adesão de células à matriz extracelular, e, conseqüentemente, à própria organização do citoesqueleto (166,168).

As fibras colágenas representam até 30% do volume do derma. Dentre elas, destacam-se, por suas funções na pele, o colágeno tipo I, principal componente encontrado; os tipos III e V, associados à tensão imposta pelo derma; o tipo IV, principal componente das membranas basais; o tipo VII, principal constituinte das fibrilas de ancoragem; o tipo VIII, presente nas células endoteliais; o tipo XII, associado à deformabilidade do derma; e o tipo XVII, localizado nos hemidesmossomas, que serve de epítipo a doenças como o penfigóide bolhoso e a epidermólise bolhosa adquirida (166).

A elasticidade da pele é conferida pelas fibras elásticas, constituídas de substância amorfa e microfibrilas, dentre as quais a microfibrilina 1 é a encontrada mais freqüentemente (166,169).

### **7.6. Metaloproteinases da matriz**

As metaloproteinases da matriz (MMPs) formam um grupo de enzimas, fundamental para o processo de remodelamento dos tecidos e degradação dos componentes da matriz extracelular e das membranas basais (170-172). Nos tecidos

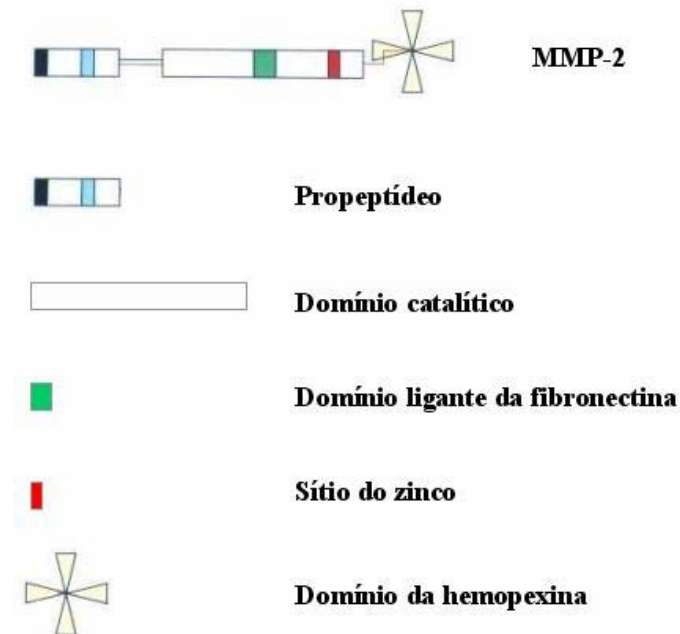
sadios, fazem parte de um mecanismo molecular complexo que atua na morfogênese e angiogênese e no processo de cicatrização (14), além de atuarem, também, durante o desenvolvimento embrionário e a reprodução (171). Entretanto, também apresentam maior expressão em diversos tecidos patológicos, tais como lesões neoplásicas, doenças inflamatórias e alterações fibróticas (14).

As MMPs, também chamadas de matrixinas, formam uma família de endopeptidases zinco-dependentes que possui a capacidade, não somente de degradar diversos componentes da matriz extracelular de maneira coordenada, tais como o colágeno, proteoglicanas e glicoproteínas, como também, de modificar as funções biológicas dessas macromoléculas (20,167,170,171). Sua expressão genética é regulada por diversos agentes efetores, tais como fatores de crescimento, citocinas, agentes químicos, estresse físico ou transformação celular oncogênica (171). Os chamados inibidores teciduais das metaloproteinases (TIMPs) são moduladores naturais da sua expressão (172,173). Medicamentos bastante utilizados como os corticóides e o ácido retinóico e outros mais recentes, como o marimastat, são exemplos de supressores químicos das MMPs (174-176).

Mais de 20 MMPs já foram identificadas (177). Elas podem ser divididas de acordo com suas funções e especificidade na clivagem de determinadas substâncias em cinco subgrupos. As collagenases intersticiais (MMP-1, -8, -12, -13, -18, -19, -20) degradam, principalmente, os colágenos I, II e III em condições fisiológicas. As gelatinases (MMP-2 e -9) atuam de modo mais eficaz no colágeno tipo IV, componente predominante das membranas basais. As matrilisinas I (MMP-7) e II (MMP-26) são as que possuem menor massa molecular. Degradam diversos componentes da matriz, sendo mais encontradas em tecidos glandulares. As estromelisinases (MMP-3, -10,-11) possuem uma atividade proteolítica limitada, e sua participação nos processos fisiológicos é incerta. As metaloproteinases da matriz de membrana são secretadas ligadas às membranas

plasmáticas das células, ao contrário das outras MMPs, que são secretadas no meio extracelular como pró-enzimas. Degradam diversos substratos e participam da ativação da progelatinase A (MMP-2). Seis enzimas fazem parte desse grupo: MT1-MMP (MMP-14), MT2-MMP (MMP-15), MT3-MMP (MMP-16), MT4-MMP (MMP-17), MT5-MMP (MMP-24) e MT6-MMP (MMP-25). Existem, ainda, outras MMPs, descobertas recentemente, que não se encaixam perfeitamente em nenhum desses grupos, tais como a MMP-12, -18, -19 e -20 (14,178).

As metaloproteinases da matriz apresentam características estruturais em comum. São formadas por um domínio contendo um pró-peptídeo com seqüência de aminoácidos (PRCGVPD) que as mantém em estado latente, ligando-se diretamente ao domínio catalítico (principal), no qual se identifica o centro ativo com o íon de zinco e 2-3 íons de cálcio, responsável pela estabilidade, ativação e interações inibitórias. Nas gelatinases, o domínio catalítico apresenta um outro com 3 repetições de fibronectina tipo II (domínio da fibronectina) que confere suas características no reconhecimento de substratos. Uma alça móvel de peptídeo faz a ligação entre o domínio catalítico e um domínio terminal de COOH, homólogo à proteína sérica hemopexina (domínio da hemopexina), o qual só não está presente nas matrilisinas. As MT-MMPs apresentam outro domínio a partir da hemopexina que lhes permite ancoragem nas membranas plasmáticas (167,178). A figura 1 apresenta, em uma versão adaptada de McGrath *et al*, o esquema estrutural das metaloproteinases, utilizando como exemplo, a MMP-2 (167).



**FIGURA 1:** Esquema das estruturas e componentes das metaloproteinasas.

As matrixinas são sintetizadas como pré-pró-enzimas e secretadas como pró-MMPs inativadas (zimógenos inativados) por diversas linhagens celulares em tecidos normais e neoplásicas (171). A ativação das pró-MMPs envolve, necessariamente, a remoção do pró-peptídeo latente. Isto acarreta a ruptura da interação quelante existente entre a cisteína do pró-peptídeo e o íon de Zinco do domínio catalítico, deixando este último livre (14). Essa ativação pode ser feita por diferentes enzimas, tais como as proteinases plasmáticas (kalikreína, tripsina, elastase neutrofílica, catepsina G e triptase), a plasmina, a MT1-MMP e proteinases bacterianas (179-182).

Uma vez que as pró-enzimas tenham sido ativadas, inibidores podem modular a proteólise e manter o equilíbrio nos processos fisiológicos em que as MMPs estejam envolvidas (14). Seus principais reguladores nos tecidos são os inibidores teciduais das

metaloproteinases (TIMPs) (171,172). Quatro tipos de TIMPs foram descritas até o momento (TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 e TIMP-4), sendo que elas têm efeitos inibitórios sobre todas as MMPs, porém em variados graus de potência (173). Em processos patológicos, há um desequilíbrio nas expressões das MMPs e TIMPs (183).

### *Gelatinases*

As metaloproteinases -2 e -9 também são conhecidas como colagenases tipo IV de 72-kDa (CLG4A) e 92-kDa (CLG4B) ou gelatinases A e B, respectivamente (14).

Os genes que as codificam possuem 13 exons, 3 a mais do que as demais MMPs, devido à presença exclusiva do domínio da fibronectina. O locus da MMP-2 está localizado no cromossomo 16 (16q13), enquanto o gene da MMP-9 parece residir no cromossomo 20 (20q11.2-q13.1) (184,185).

A regulação da atividade das gelatinases envolve basicamente três etapas. Inicialmente, fatores transcripcionais, como o AP-1 e o NF-kappaB, controlam a transcrição das pró-MMPs inativas. Em seguida, elas são clivadas por enzimas proteolíticas na sua forma ativa. Por fim, sofrem inibição dos inibidores teciduais das metaloproteinases (TIMPs) (186).

A expressão das gelatinases varia de acordo com o tipo de célula estudado (187). São secretadas, de modo constitucional, por células inflamatórias, fibroblastos e queratinócitos, em processos fisiológicos, como o remodelamento tecidual e o de cicatrização (14). Degradam o colágeno desnaturado (gelatina), colágeno nativo tipo -I, -V, -VI e -X e têm, nos principais componentes das membranas basais (colágeno tipo -IV, fibronectina, laminina), importantes substratos (178,188). Por isso, também exercem papel fundamental em situações patológicas que necessitem da degradação das membranas basais e da matriz extracelular para migração celular, como, por exemplo, a invasão tumoral e a infiltração de linfócitos T nas doenças inflamatórias (189-191). Nessas

situações, tais linhagens celulares podem tanto aumentar a expressão das gelatinases co-estimuladas por agentes efetores (oncogenes, citocinas e fatores do crescimento), como também, ser secretadas por outros tipos de células (células tumorais, macrófagos) (171,191,192).

As citocinas mais envolvidas na secreção da pró-MMP -2 pelas células são a IL-1, que também estimula a ativação da MT1-MMP, o TNF- $\alpha$  (*tumor necrosis factor- $\alpha$*  – fator de necrose tumoral- $\alpha$ ) e o TGF- $\beta$  (*transforming growth factor- $\beta$*  – fator de crescimento transformante- $\beta$ ) (193,194). Em relação à MMP-9, tanto o TNF- $\alpha$  quanto o TGF- $\beta$  participam, também, tanto de secreção da sua pró-enzima, como de sua ativação (195-197).

Através de um mecanismo autócrino, as próprias MMPs podem influenciar suas expressões. Elas têm a capacidade de transformar as proformas das citocinas (IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-4), liberadas pelas células e necessárias para secreção das pró-enzimas MMPs, em suas formas ativas (198).

O peso molecular das metaloproteinases -2 e -9 diminui quando passa da forma latente para a forma ativada. Isto se deve à perda do domínio pró-peptídeo, pela ação de enzimas proteolíticas (MT1-MMP, plasmina, tripsina) (186,199,200). Na forma ativada, a MMP-2 passa a ter um peso molecular de 62-kDa (72-kDa, na forma inativada), enquanto a MMP-9 ativada tem um peso de 82-kDa (92-kDa, na forma inativada) (196,200).

A expressão das gelatinases pode ser inibida pela expressão dos TIMPs (14). No caso das MMP-2 e -9, os TIMP-1 e 2 são os mais importantes. Ambos têm peso molecular pequeno, 29 e 21 kDa, respectivamente (14). As TIMPs contêm dois domínios. O domínio terminal N é o principal responsável pela ação inibitória, fazendo ligações não covalentes com os sítios de zinco do domínio ativo das MMPs (201). O equilíbrio entre a

expressão das MMPs e seus inibidores naturais é que determina a atividade proteolítica em processos fisiológicos ou patológicos (14).

Gelatinases são as principais MMPs expressas por queratinócitos cultivados (202). Kobayashi *et al*, usando fibroblastos e queratinócitos cutâneos *in vitro*, mostraram que a MMP-2 era secretada de modo constitucional por fibroblastos e queratinócitos, enquanto a MMP-9 somente pelos queratinócitos. Entretanto, a expressão de MMP-9 foi induzida após a adição do TGF- $\beta$ 1 ou do TNF- $\alpha$ . Ainda, quando acrescidos o TGF- $\beta$ 1, TNF- $\alpha$  ou fator de crescimento epidérmico nas culturas, houve aumento da secreção de MMP-2 pelos fibroblastos (177).

Expressões constitucionais de gelatinases também são encontradas em células endoteliais, através do estímulo do acetato-miristato de forbol (PMA) durante a angiogênese (203,204).

A secreção constitucional das metaloproteinases -2 e -9 em melanócitos parece existir. Um estudo *in vitro* demonstrou que os melanócitos são capazes de produzir MMP-2 e -9 (205). Lei *et al* estudaram melanoblastos (precursores de melanócitos), em cultura, e observaram expressão das gelatinases, apesar de somente a MMP-9 ser encontrada na forma ativa extracelular (206). Entretanto, Elshaw *et al* não observaram sua expressão em melanócitos coroidais em cultura (207). *In vitro*, melanócitos uveais expressaram tanto MMP-2, quanto MMP-9. Quando estimulados com acetato de forbol, tiveram suas expressões aumentadas (188).

As gelatinases têm sua atividade implicada na gênese de diversas situações patológicas nos mais diferentes órgãos, tais como carcinomas cervicais, de pulmão, de esôfago, de tireóide, de laringe, de cólon, tumores cerebrais, artrite reumatóide e psoriática, insuficiência venosa crônica, doença de Dupuytren, placas ateroscleróticas, esclerose sistêmica e enfisema pulmonar (208-220).



A pele não é exceção. Nela, distintos processos patológicos podem apresentar aumento da expressão das gelatinases, como nos exemplos que mais adiante serão apresentados.

#### *Métodos para o estudo da expressão das gelatinases no tecido cutâneo*

Estudos experimentais, realizados para análise da expressão das metaloproteinases da matriz, utilizam diferentes métodos para sua detecção. A escolha deve ser feita, baseando-se na disponibilidade e no domínio da técnica, bem como no tipo de material biológico a ser estudado. Entre as técnicas existentes, pode-se citar: a hibridização *in situ* (9,21,221,222), a imunistoquímica (18,183,223-232), a zimografia (9,21,183,221,223,226,228,231,233-237), o Western-blotting (9,183,227,228,234,238), o *Northern blot* (183,229), a citometria de fluxo (238), o radioisótopo (239), o ELISA (221,231,233,237), e a reação em cadeia da polimerase (183,221,226,230). Entretanto os métodos mais empregados são a imunistoquímica e a zimografia.

A zimografia reconhece as metaloproteinases pela degradação de seus substratos preferenciais e pelo seu peso molecular. Permite, conseqüentemente, identificar e diferenciar as formas latentes e ativadas das MMPs. Por isso, é utilizada com grande freqüência em experimentos que avaliam a expressão das gelatinases (240). O procedimento consiste em incubar células ou tecidos em géis de poliacrilamida que podem conter diferentes substratos como gelatina, caseína e fibrina. A atividade gelatinolítica aparece na zimografia como bandas líticas não coradas, com fundo escuro. Através da eletroforese, identifica-se o peso molecular da enzima degradante (237,241). Esse método é particularmente útil para a avaliação da atividade das gelatinases em cultivos de células e material biológico em fluidos (237,239).

A imunistoquímica permite identificar antígenos baseando-se no reconhecimento antígeno-anticorpo (242). É mais utilizada em material biológico sólido, podendo ser

efetuada sob técnicas de imunofluorescência ou imunoenzimáticas. A imunofluorescência usa material biológico em congelação. Os anticorpos são marcados com fluorocromos. Necessita de iluminação e microscópios específicos. As reações antígeno-anticorpo apresentam fluorescência característica. Com o tempo, as lâminas desbotam (243). Os métodos imunoenzimáticos apresentam vantagens em relação à imunofluorescência: costumam utilizar tecidos parafinados, requerem microscopia e iluminação padrão e têm durabilidade maior, podendo ser examinadas diversas vezes (243). Podem ser empregados anticorpos policlonais, mais sensíveis por reconhecerem alguns epítomos de um mesmo antígeno, ou, monoclonais, que são mais específicos, devido à sua afinidade por somente um epítomo (242).

A técnica imunoenzimática, mais empregada no estudo das gelatinases, é a imunoperoxidase. Inicialmente, é necessário desparafinizar e hidratar (xilol, álcool e água destilada) os cortes. Em seguida, faz-se a recuperação antigênica para exaltar os antígenos teciduais e o bloqueio da peroxidase endógena, com vistas a se evitarem reações falso-positivas. Aplicam-se o anticorpo primário (MMP-2 e -9) e o secundário, associados ao complexo avidina-biotina. A avidina é uma glicoproteína com alta afinidade pela biotina, sendo sua ligação irreversível. Possui pontes de ligação também para proteínas presentes em enzimas e anticorpos; conseqüentemente, é capaz de formar complexos macromoleculares entre a avidina e as enzimas biotinizadas. A adição da diaminabenzidina, cromógeno que exalta esses complexos, expõe as áreas antigênicas em tons de marrom (242,244,245).

#### *Gelatinases e suas expressões em distintas doenças cutâneas*

- Rosácea:

Em nosso meio, Bonamigo avaliou a participação das gelatinases na fisiopatologia da rosácea inflamatória através de um estudo imunistoquímico com 34 casos de rosácea

e 29 controles. Em sua amostra, não foram detectadas diferenças de expressão entre os grupos para MMP-2. Em relação à MMP-9, o grupo da rosácea apresentava maior expressão nos histiócitos e na matriz extracelular, do que o grupo controle. O autor conclui que a MMP-9 provavelmente se constitui em um mediador patogênico da rosácea inflamatória (246). O *Demodex folliculorum* é considerado um possível cofator na fisiopatologia da rosácea. Nos casos de rosácea em que o *Demodex folliculorum* estava presente (35,3%), a expressão da MMP-9 era mais intensa em fibroblastos, colaborando com a possibilidade dessa infecção estar relacionada a certas formas de apresentação da rosácea (247).

Pacientes com rosácea ocular apresentam expressões maiores de pró-gelatinase B e gelatinase B no líquido lacrimal do que pacientes normais (248).

- Psoríase:

O efeito das gelatinases na psoríase foi avaliado em um estudo com 19 pacientes. As expressões das MMP-2 e -9, assim como de seus inibidores, TIMP-1 e -2, foram detectadas por método de imunistoquímica e de PCR. A MMP-2 teve sua expressão positiva em 14 pacientes nos queratinócitos e na derme superior, principalmente ao redor de vasos. A MMP-9 foi positiva somente na derme papilar em 15 casos. Os inibidores das MMPs foram negativos em todos casos. O aumento de expressão das MMPs e a perda do poder inibitório sugerem que elas participem do remodelamento tecidual na psoríase (230).

- Líquen Plano:

Lesões agudas de líquen plano apresentaram, no exame anatomo-patológico, ruptura da zona da membrana basal, degeneração de queratinócitos basais com perda de tonofilamentos e hemidesmossomos e formação de bolhas. Em um estudo, observou-se o aumento da expressão da MMP-2 com redução do TIMP-2 em lesões agudas de líquen plano, enquanto a expressão de MMP-9 não se diferencia dos controles. Nas lesões

crônicas, ambas as gelatinases eram negativas. Os autores concluem que a gelatinase A contribui para a degeneração da camada basal e para a formação de vesículas, na fase aguda da doença (249).

- Doenças bolhosas e acantolíticas:

É sugerido que a gelatinase B contribua com a ação proteolítica dos granulócitos, que resulta na separação da junção dermo-epidérmica na pele de pacientes com penfigóide bolhoso e epidermólise bolhosa adquirida (250). Camundongos deficientes na produção de gelatinase B não eram capazes de gerar vesículas, quando inoculados com anticorpos anti-mBP180 (251). A expressão da MMP-9 também foi detectada em células diskeratóticas e acantolíticas de pacientes com doença de Darier e Hailey-Hailey (228).

- Farmacodermias:

A análise, por zimografia, do fluido de bolhas de pacientes com necrólise epidérmica tóxica (NET) demonstrou a marcada presença de MMP-2 na forma ativada (239). Dois pacientes com NET e três com síndrome de Stevens-Johnson tiveram expressões aumentadas de MMP-2 e -9, em biópsias de bolhas, pelo método de *Western blotting*, ELISA e zimografia (237).

- Dermatite de contato:

Biópsias de 15 pacientes, que tiveram teste epicutâneo positivo, foram avaliadas, comparando o lado reativo com a pele normal. As gelatinases eram forte-positivas na epiderme, tecido conjuntivo e reação inflamatória do lado eczematoso, enquanto se apresentavam fracamente positivas na camada basal da epiderme do lado não reativo (226).

- Anetodermias:

Três lesões anetodérmicas foram avaliadas por método de cultura e zimografia e comparadas com pele normal. Os lados afetados evidenciaram aumento da expressão das pró-MMP-2 e -9 e da MMP-2 ativada, o que pode estar relacionado com a

degradação do tecido elástico nesses pacientes (252). Posteriormente, investigadores, ligados ao mesmo grupo do experimento anterior, mostraram que a MMP-3, -7 e -9 também estão envolvidas nesse processo (253).

- Úlceras:

A proteólise extracelular faz parte do mecanismo fisiológico de reparação e cicatrização; entretanto uma ação proteolítica exagerada pode representar um complicador no fechamento de úlceras (254). Um estudo comparou a expressão das gelatinases, por método de zimografia, em feridas agudas (pós-mastectomia) e crônicas (úlceras de perna). Os autores encontraram aumento da expressão das gelatinases nos pacientes com úlceras crônicas de perna (255). Tais achados confirmam o relato de Weckroth *et al*, que também observaram aumento das gelatinases em exudato de úlceras crônicas (254). Outros trabalhos também observaram aumento da expressão de gelatinases ativadas na superfície de úlceras de pressão crônicas e secundárias à insuficiência venosa (256,257). Mais ainda, Ladwig *et al* observaram uma diminuição gradual do índice MM-9/TIMP-1, à medida que úlceras crônicas cicatrizavam (258). Esses achados sugerem que a grande presença das metaloproteinases -2 e -9 na superfície de úlceras possa retardar sua reparação tecidual.

- Quelóides e cicatrizes hipertróficas:

Um estudo com 10 pacientes com cicatrizes hipertróficas e 9 com quelóides, utilizando técnica de zimografia e de *Western Blotting*, evidenciou aumento da expressão da MMP-2 latente e ativada nessas lesões, mostrando seu efeito em tecidos com remodelamento tecidual prolongado. Já a MMP-9 apresentou expressão fraca ou negativa (259).

- Micoose fungóide:

Em um estudo com pacientes portadores de micoose fungóide, Vacca e colaboradores realizaram biópsia em 57 lesões, agrupando-as de acordo com o estágio

de evolução da doença (mancha – placa – nódulo). As expressões das MMP-2 e –9 foram avaliadas por estudo imunohistoquímico e hibridização *in situ*. Os casos mais avançados (nódulos) tiveram maiores expressões de MMP-2 (78,9% das lesões) e de MMP-9 (52,6% das lesões), enquanto, 59,1% e 31,8% das lesões em placa expressaram MMP-2 e MMP-9, respectivamente. Nas lesões mais precoces (manchas), somente 37,5% e 12,5% eram positivas para as gelatinases. A angiogênese também aumentou, juntamente com a gravidade da doença. Os autores concluem que a degradação da matriz extracelular com invasão de células tumorais e a angiogênese ocorrem simultaneamente na micose fungóide e que as gelatinases exercem importante papel neste processo (222).

- Fotoenvelhecimento:

O acúmulo de material basofílico na derme superior (elastose solar) é o principal marcador histopatológico do fotodano crônico. Ohnishi *et al* compararam a expressão de metaloproteinases com os métodos de imunohistoquímica e *Northern Blot* em pele normal e fotoenvelhecida. Na pele fotolesada, observaram expressão forte de MMP-1, -2 e -3 e fraca da -9, enquanto na pele normal essas expressões eram negativas (229).

Esses achados histopatológicos, induzidos pela radiação ultravioleta na derme, são o reflexo da degradação e remodelamento do colágeno. Nesse processo, as metaloproteinases parecem contribuir de maneira consistente, devido às propriedades proteolíticas que possuem. Fisher *et al* estudaram o efeito de irradiações repetidas na pele e a expressão das MMP-1, -2 e -3. Encontraram um aumento das expressões das MMPs nos tecidos irradiados. Mais ainda, locais tratados previamente com tretinoína tópica apresentaram expressões de MMPs inibidas, mostrando que os retinóides podem beneficiar peles fotoenvelhecidas (9).

- Neoplasias queratinocíticas:

As metaloproteinases participam da progressão tumoral em carcinomas basocelulares e epidermóides. As células estromais são as principais fontes de MMPs, apesar de as células neoplásicas serem também produtoras (227,260).

Um estudo imunohistoquímico da expressão da MMP-2 em ceratoses actínicas e carcinomas espinocelulares demonstrou que os carcinomas invasivos apresentavam marcada expressão em relação às ceratoses actínicas e aos carcinomas *in situ* (261). Verdolini *et al* avaliaram, também, nessas lesões, as expressões das duas gelatinases. Observaram expressão de MMP-9 em células neoplásicas nos pontos infiltrativos dos carcinomas microinvasores, em focos disceratóticos da doença de Bowen e nos tumores invasivos (262). Um estudo comparou a expressão imunohistoquímica das gelatinases em carcinomas basocelulares (CBC) e epidermóides, detectando um aumento da expressão desses em relação aos CBCs. Os autores concluíram que esses achados poderiam estar relacionados ao fato de os carcinomas epidermóides apresentarem mais casos que geram metástases (263).

#### *Gelatinases e suas expressões em lesões pigmentares*

Os processos de invasão tumoral e formação de metástases ocorrem a partir de uma complexa cascata de eventos. Iniciam com o desprendimento de células do sítio primário, sendo seguidos pela invasão de tecidos circundantes, neoangiogênese, penetração nos vasos sanguíneos e linfáticos e adesão a órgãos à distância. A ação de enzimas proteolíticas na degradação e remodelamento da matriz extracelular e das membranas basais é fundamental em meio a esse processo (16,234).

O melanoma é considerado uma neoplasia altamente invasiva (238). As gelatinases são as enzimas proteolíticas mais importantes na degradação do colágeno tipo IV, principal constituinte das membranas basais pericelulares e da junção dermo-epidérmica; por isso, participam da migração de células tumorais, interagindo com

moléculas de adesão (integrinas) (264), fatores de crescimento e mediadores da angiogênese, do remodelamento da matriz extracelular e da neoangiogênese, pontos importantes para a invasão tumoral (234,265,266). As gelatinases podem ser produzidas diretamente pelas células neoplásicas ou pelas células estromais, podendo ser aproveitadas no processo invasivo (238,266).

A MMP-2 parece ser a enzima gelatinolítica mais importante no processo invasivo do melanoma. Sua expressão e ativação parecem aumentar na proporção da agressividade do tumor (225,267). Pode ser detectada, principalmente, nos sítios de ligação estroma-tumor (223).

Vaisanen *et al* estudaram a expressão da MMP-2 em 118 lesões melanocíticas, tais como: nevos melanocíticos, nevos displásicos, melanomas *in situ* e melanomas invasivos. Encontraram uma expressão fraca na maioria dos nevos melanocíticos e displásicos; porém o número de células positivas aumentava de acordo com o grau de atipia. A maioria dos melanomas *in situ* tinha expressão de MMP-2, porém fraca. Nos melanomas invasivos, a maior parte era fortemente positiva e tinha uma tendência no aumento de sua expressão nos tumores com índice de Breslow mais espessos e no melanoma metastático, sugerindo que a expressão da MMP-2 no melanoma é um evento de início precoce e que pode ter um valor prognóstico (224).

Simonetti *et al* realizaram um estudo semelhante ao anterior, avaliando a expressão das MMP-2 e -9 em nevos melanocíticos e melanomas. Com relação à MMP-2, os achados foram semelhantes, tendo expressões fracamente positivas em lesões benignas e mostrando uma tendência a se expressar mais em tumores invasivos. A expressão de MMP-9 foi negativa nas lesões benignas. Nos melanomas, ela estava presente, em proporção semelhante em lesões *in situ* e invasivas (18).

Em outro experimento, van de Oord *et al* encontraram a expressão de MMP-9 aumentada em 63% dos melanomas com Breslow < 1,6mm e somente em 10% dos



melanomas com >1,6mm ou metastáticos, sugerindo que a MMP-9 tenha sua ação principal na invasão precoce dos melanomas. Lentigos malignos não expressavam gelatinase B, colaborando com o seu curso indolente. Nevos melanocíticos também não apresentaram sua expressão (17).

A MMP-9 tem sua expressão regulada nos vasos pelo fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), responsável pela regulação da angiogênese fisiológica e patológica. Em melanomas invasivos, encontrou-se uma relação entre a expressão das gelatinases e do VEGF, evidenciando seu papel, também, na neoangiogênese tumoral (18,268). Além disso, estudo *in vitro* mostrou que células endoteliais podem armazenar formas ativadas de MMP-9 para secreção imediata, o que poderia facilitar sua migração durante o processo angiogênico (269).

#### *Gelatinases e suas expressões com a radiação ultravioleta*

A radiação ultravioleta pode agir como indutora de diversos genes, entre eles, os que regulam a expressão das metaloproteinases (20). Fisher *et al* avaliaram biópsias de pele, irradiadas previamente com UVB, e observaram que essa induz a ativação dos fatores transcripcionais AP-1 e NF-kappa B que regulam a expressão do RNAm-MMP-9 (9,270).

Koivukangas *et al* avaliaram biópsias de pele e fluidos de bolhas de pacientes que haviam sido tratados com PUVA, UVB ou que não tinham recebido tratamento com radiação ultravioleta. Observaram aumento da expressão das gelatinases A e B nos grupos tratados com UVB ou PUVA, em relação ao outro grupo, principalmente, em fibroblastos (21).

Em queratinócitos cultivados, a UVB aumentou a expressão da MMP-9, e não da MMP-2, após irradiação com UVB (233).

### *Gelatinases e suas expressões em nevos melanocíticos irradiados*

A expressão de gelatinases em nevos melanocíticos costuma ser fraca; entretanto, parece aumentar quando se observam atipias. Já foi visto que nevos irradiados apresentam alterações morfológicas transitórias importantes como aumento de núcleos, citoplasma e até atipias de melanócitos (6). Por isso, irradiar nevos tornou-se uma maneira interessante de se avaliarem as modificações que a radiação ultravioleta efetua nas lesões pigmentares *in vivo* e, talvez, contribuir para uma melhor compreensão do processo de formação dos melanomas.

Pouco se sabe em relação à expressão das gelatinases em nevos, após irradiação por UVB. Krenzel e colaboradores irradiaram 10 nevos melanocíticos com 4 DEM e excisaram as lesões uma semana após. Avaliaram somente a expressão imunistoquímica da MMP-2, porém não da MMP-9. No lado não-irradiado, observaram que os queratinócitos expressavam, de modo fraco a moderado, a MMP-2 em 8 dos 10 nevos e que, nos melanócitos, não houve essa expressão. No lado irradiado, as camadas epidérmicas apresentavam expressão de moderada a forte em 8 nevos, e, igualmente ao lado não irradiado, os melanócitos continuavam sem expressá-la. Outras linhagens celulares, como fibroblastos e células endoteliais, não foram avaliadas (12).

Até o momento, faltam estudos na literatura que permitam compreender, com maior clareza, o comportamento da expressão da gelatinase A, após irradiação por UVB, nas diferentes linhagens celulares que compõem os nevos melanocíticos, não existindo relatos de experimentos que avaliem a expressão da gelatinase B nestas estruturas.

## 8. OBJETIVOS

### 8.1. Objetivo principal:

Avaliar o efeito da radiação ultravioleta B na expressão imunoistoquímica das gelatinases (MMP-2 e -9) em nevos melanocíticos.

### 8.2. Objetivos secundários:

Avaliar os efeitos da radiação ultravioleta B na expressão imunoistoquímica de metaloproteinases -2 e -9 em células melanocíticas na camada basal da epiderme e nas células dos ninhos névicos dérmicos.

Avaliar os efeitos da radiação ultravioleta B na expressão imunoistoquímica de metaloproteinases -2 e -9 em queratinócitos.

Avaliar os efeitos da radiação ultravioleta B na expressão imunoistoquímica de metaloproteinases -2 e -9 em componentes do derma superior, como células endoteliais e fibroblastos.

## 9. REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA

1. MacKie RM. Disorders of the Cutaneous Melanocyte. In: Burns T, Breathnach S, Cox N, Griffiths C, editors. *Rook's Textbook of Dermatology*. 7<sup>th</sup> ed. Oxford: Blackwell Publishing; 2005. p. 38.1-39.
2. Marks R, editor. *Sun-damaged Skin* 1<sup>st</sup> ed. London: Martin Dunitz Ltd; 1992. p 1-72.
3. Holly EA, Kelly JW, Shpall SN, Chiu SH. Number of melanocytic nevi as a major risk factor for malignant melanoma. *J Am Acad Dermatol* 1987;17(3):459-68.
4. Bauer J, Garbe C. Acquired melanocytic nevi as risk factor for melanoma development. A comprehensive review of epidemiological data. *Pigment Cell Res* 2003;16(3):297-306.
5. Tronnier M, Smolle J, Wolff HH. Ultraviolet irradiation induces acute changes in melanocytic nevi. *J Invest Dermatol* 1995;104(4):475-8.
6. Tronnier M, Wolff HH. UV-irradiated melanocytic nevi simulating melanoma in situ. *Am J Dermatopathol* 1995;17(1):1-6.
7. Gallagher RP, Rivers JK, Lee TK, Bajdik CD, McLean DI, Coldman AJ. Broad-spectrum sunscreen use and the development of new nevi in white children: A randomized controlled trial. *JAMA* 2000;283(22):2955-60.
8. Bakos L, Wagner M, Bakos RM, Leite C, Sperhacke C, Dzekaniak K, *et al.* Sunburn, sunscreens and phenotypes: some risk factors for cutaneous melanoma in southern Brazil. *Int J Dermatol* 2002; 41:557:62.
9. Fisher GJ, Wang Z, Datta SC, Varani J, Kang S, Voorhees JJ. Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light. *N Engl J Med* 1997; 337(20):1419-28.
10. Frost C, Green A, Nguyen TD. Ultraviolet radiation, melanocytic naevi and their dose-response relationship. *Br J Dermatol* 1997;137 (1):91-5.

11. Vandenberg JL, Hubbard DL, Robinson ES. Genetic analysis of ultraviolet radiation-induced skin hyperplasia and neoplasia in a laboratory. *Arch Dermatol Res* 1994; 286(1):12-7.
12. Krengel S, Alexander M, Brinckmann J, Tronnier M. MMP-2, TIMP-2 and MT1-MMP are differentially expressed in lesional skin of melanocytic nevi and their expression is modulated by UVB-light. *J Cutan Pathol* 2002;29(7):390-6.
13. Mariante JC. Alterações Clínicas, dermatoscópicas, histopatológicas e imuno-histoquímicas de nevos melanocíticos irradiados com raios ultravioleta B [dissertação]. Porto Alegre(RS): UFRGS;2003.
14. Seltzer JL, Eisen AZ. The role of extracellular matrix metalloproteinases in connective tissue remodeling. In: Freedberg IM, Eisen AZ, Wolff K, Austen KF, Goldsmith LA, Katz SI, editors. *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine*. 6<sup>th</sup> ed. New York: McGraw-Hill; 2003. p.200-9.
15. Raza SL, Cornelius LA. Matriz metalloproteinases: pro- and anti-angiogenic activities. *J Investig Dermatol Symp Proc* 2000;5:47-54.
16. Hofmann UB, Westphal JR, Van Muijen GN, Ruitter DJ. Matrix metalloproteinases in human melanoma. *J Invest Dermatol* 2000;115(3):337-44.
17. Van den Oord JJ, Paemen L, Opnednakker G, De Wolf-Peeters C. Expression of gelatinase B and the extracellular matrix metalloproteinase inducer EMMPRIN in benign and malignant pigment cell lesions of the skin. *Am J Pathol* 1997;151(3):665-70.
18. 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.
19. De Raeve L, Dierickx K, Morandini R, Roseeuw D, Ghanem G. PP-11 Giant congenital melanocytic naevi: in vitro characteristics. *Pigment Cell Res* 2003;16(5):596.

20. Brenneisen P, Sies H, Scharfetter-Kochanek K. Ultraviolet-B irradiation and matrix metalloproteinases: from induction via signaling to initial events. *Ann N Y Acad Sci* 2002;973:31-43.
21. Koivukangas V, Kallioinen M, Autio-Harmainen H, Oikarinen A. UV irradiation induces the expression of gelatinases in human skin in vivo. *Acta Derm Venereol* 1994;74(4):279-82.
22. Happle R. What is a nevus? A proposed definition of a common medical term. *Dermatology* 1995;191(1):1-5.
23. Bergstresser PR, Costner MI. Anatomy and Physiology. In: Bologna JL, Jorizzo JL, Rapini RP, editors. *Dermatology*. 1<sup>st</sup> ed. London: Mosby; 2003. p. 25-38.
24. Berg P, Lindelof B. Congenital melanocytic naevi and cutaneous melanoma. *Melanoma Res* 2003;13(5):441-5.
25. Osburn K, Schosser RH, Everett MA. Congenital pigmented and vascular lesions in newborn infants. *J Am Acad Dermatol* 1987;16(4):788-92.
26. Kroon S, Clemmensen OJ, Hastrup N. Incidence of congenital melanocytic nevi in newborn babies in Denmark. *J Am Acad Dermatol* 1987;17(3):422-6.
27. Walton RG, Jacobs AH, Cox AJ. Pigmented lesions in newborn infants. *Br J Dermatol* 1976;95(4):389-96.
28. Tannous ZS, Mihm MC Jr, Sober AJ, Duncan LM. Congenital melanocytic nevi: clinical and histopathologic features, risk of melanoma, and clinical management. *J Am Acad Dermatol* 2005;52(2):197-203.
29. MacKie RM, English J, Aitchinson TC, *et al*. The number and distribution of benign melanocytic naevi in a healthy British population. *Br J Dermatol* 1985;113:167-74.
30. Synnerstad I, Nilsson L, Fredrikson M, Rosdahl I. Frequency and distribution pattern of melanocytic naevi in Swedish 8-9-year-old children. *Acta Derm Venereol* 2004;84(4):271-6.

31. Rokuhara S, Saida T, Oguchi M, Matsumoto K, Murase S, Oguchi S. Number of acquired melanocytic nevi in patients with melanoma and control subjects in Japan: Nevus count is a significant risk factor for nonacral melanoma but not for acral melanoma. *J Am Acad Dermatol* 2004;50(5):695-700.
32. Whiteman DC, Brown RM, Purdie DM, Hughes MC. Melanocytic nevi in very young children: the role of phenotype, sun exposure, and sun protection. *J Am Acad Dermatol* 2005;52(1):40-7.
33. Wiecker TS, Luther H, Buettner P, Bauer J, Garbe C. Moderate sun exposure and nevus counts in parents are associated with development of melanocytic nevi in childhood: a risk factor study in 1,812 kindergarten children. *Cancer* 2003;97(3):628-38.
34. Darlington S, Siskind V, Green L, Green A. Longitudinal study of melanocytic nevi in adolescents. *J Am Acad Dermatol* 2002;46(5):715-22.
35. Kopf AW, Bart RS, Hennessey P. Congenital nevocytic nevi and malignant melanomas. *J Am Acad Dermatol* 1979;1(2):123-30.
36. Berg P, Lindelof B. Congenital nevocytic nevi: follow-up of a Swedish birth register sample regarding etiologic factors, discomfort, and removal rate. *Pediatr Dermatol* 2002;19(4):293-7.
37. Kanzler MH, Mraz-Gernhard S. Primary cutaneous malignant melanoma and its precursor lesions: diagnostic and therapeutic overview. *J Am Acad Dermatol* 2001;45(2):260-76.
38. Consensus conference: Precursors to malignant melanoma. *JAMA* 1984;251(14):1864-6.
39. Barnhill RL, Lewell YNK. Benign Melanocytic Neoplasms. In: Bologna JL, Jorizzo JL, Rapini RP, editors. *Dermatology*. 1<sup>st</sup> ed. London: Mosby; 2003. p. 1757-89.

40. Lever WF, Schaumburg-Lever G, editors. Benign Melanocytic Tumors and malignant melanoma Histopathology of the skin. 7<sup>th</sup> ed. Philadelphia: J. B. Lippincott Company; 1990. p. 756-806.
41. Florell SR, Meyer LJ, Boucher KM, Porter-Gill PA, Hart M, Erickson J, *et al.* Longitudinal assessment of the nevus phenotype in a melanoma kindred. *J Invest Dermatol* 2004;123(3):576-82.
42. Wachsmuth RC, Gaut RM, Barrett JH, Saunders CL, Randerson-Moor JA, Eldridge A, *et al.* Heritability and gene-environment interactions for melanocytic nevus density examined in a U.K. adolescent twin study. *J Invest Dermatol* 2001;117(2):348-52.
43. Zhu G, Duffy DL, Eldridge A, Grace M, Mayne C, O'Gorman L, *et al.* A major quantitative-trait locus for mole density is linked to the familial melanoma gene CDKN2A: a maximum-likelihood combined linkage and association analysis in twins and their sibs. *Am J Hum Genet* 1999;65(2):483-92.
44. Wachsmuth RC, Turner F, Barrett JH, Gaut R, Randerson-Moor JA, Bishop DT, *et al.* The effect of sun exposure in determining nevus density in UK adolescent twins. *J Invest Dermatol* 2005;124(1):56-62.
45. Saldanha G, Purnell D, Fletcher A, Potter L, Gillies A, Pringle JH. High BRAF mutation frequency does not characterize all melanocytic tumor types. *Int J Cancer* 2004;111(5):705-10.
46. Kumar R, Angelini S, Snellman E, Hemminki K. BRAF mutations are common somatic events in melanocytic nevi. *J Invest Dermatol* 2004;122(2):342-8.
47. Barrett JH, Gaut R, Wachsmuth R, Bishop JA, Bishop DT. Linkage and association analysis of nevus density and the region containing the melanoma gene CDKN2A in UK twins. *Br J Cancer* 2003;88(12):1920-4.
48. Papp T, Pemsel H, Zimmermann R, Batrop R, Weiss DG, Schiffmann D. Mutational analysis of the N-ras, p53, p16INK4a, CDK4, and MC1R genes in human congenital



melanocytic naevi. *J Med Genet* 1999;36(8):610-4.

49. Papp T, Pemsel H, Rollwitz I, Schipper H, Weiss DG, Schiffmann D, *et al.* Mutational analysis of N-ras, p53, CDKN2A (p16(INK4a)), p14(ARF), CDK4, and MC1R genes in human dysplastic melanocytic naevi. *J Med Genet* 2003;40(2):E14.

50. Takayama H, Nagashima Y, Hara M, Takagi H, Mori M, Merlino G, *et al.*

Immunohistochemical detection of the c-met proto-oncogene product in the congenital melanocytic nevus of an infant with neurocutaneous melanosis. *J Am Acad Dermatol* 2001;44(3):538-40.

51. Valiukeviciene S, Miseviciene I, Gollnick H. The prevalence of common acquired melanocytic nevi and the relationship with skin type characteristics and sun exposure among children in Lithuania. *Arch Dermatol* 2005;141(5):579-86.

52. Gallagher RP, McLean DI, Yang CP, Coldman AJ, Silver HK, Spinelli JJ, *et al.* Suntan, sunburn, and pigmentation factors and the frequency of acquired melanocytic nevi in children. Similarities to melanoma: the Vancouver Mole Study. *Arch Dermatol* 1990;126(6):770-6.

53. Carli P, Naldi L, Lovati S, La Vecchia C. The density of melanocytic nevi correlates with constitutional variables and history of sunburns: a prevalence study among Italian schoolchildren. *Int J Cancer* 2002;101(4):375-9.

54. Harrison SL, MacLennan R, Speare R, Wronski I. Sun exposure and melanocytic naevi in young Australian children. *Lancet* 1994;344(8936):1529-32.

55. Kennedy C, Bajdik CD, Willemze R, De Gruijl FR, Bouwes Bavinck JN. The influence of painful sunburns and lifetime sun exposure on the risk of actinic keratoses, seborrheic warts, melanocytic nevi, atypical nevi, and skin cancer. *J Invest Dermatol* 2003;120(6):1087-93.

56. Breitbart M, Garbe C, Buttner P, Weiss J, Soyer HP, Stocker U, *et al.* Ultraviolet light exposure, pigmentary traits and the development of melanocytic naevi and cutaneous

melanoma. A case-control study of the German Central Malignant Melanoma Registry.

*Acta Derm Venereol* 1997;77(5):374-8.

57. Bataille V, Grulich A, Sasieni P, Swerdlow A, Newton Bishop J, McCarthy W, *et al.* The association between naevi and melanoma in populations with different levels of sun exposure: a joint case-control study of melanoma in the UK and Australia. *Br J Cancer* 1998;77(3):505-10.

58. Menzies SW, Greenoak GE, Abeywardana CM, Crotty KA, O'Neill ME. UV light from 290 to 325 nm, but not broad-band UVA or visible light, augments the formation of melanocytic nevi in a guinea-pig model for human nevi. *J Invest Dermatol* 2004;123(2):354-60.

59. Autier P, Dore JF, Reis AC, Grivegne A, Ollivaud L, Truchetet F, *et al.* Sunscreen use and intentional exposure to ultraviolet A and B radiation: a double blind randomized trial using personal dosimeters. *Br J Cancer* 2000;83(9):1243-8.

60. Autier P, Dore JF, Negrier S, Lienard D, Panizzon R, Lejeune FJ, *et al.* Sunscreen use and duration of sun exposure: a double-blind, randomized trial. *J Natl Cancer Inst* 1999;91(15):1304-9.

61. Gontier E, Cario-Andre M, Vergnes P, Bizik J, Surleve-Bazeille JE, Taieb A. The 'Abtropfung phenomenon' revisited: Dermal nevus cells from congenital nevi cannot activate matrix metalloproteinase 2 (MMP-2). *Pigment Cell Res* 2003;16(4):366-73.

62. Riley PA. Naevogenesis: a hypothesis concerning the control of proliferation of melanocytes with special reference to the growth of intradermal naevi. *Dermatology* 1997;194(3):201-4.

63. Schaumburg-Lever G, Lever I, Fehrenbacher B, Moller H, Bischof B, Kaiserling E, *et al.* Melanocytes in nevi and melanomas synthesize basement membrane and basement membrane-like material. An immunohistochemical and electron microscopic study including immunoelectron microscopy. *J Cutan Pathol* 2000;27(2):67-75.

64. Reed JA, Finnerty B, Albino AP. Divergent cellular differentiation pathways during the invasive stage of cutaneous malignant melanoma progression. *Am J Pathol* 1999;155(2):549-55.
65. Worret WI, Burgdorf W. Which Direction Do Nevus Cells Move? Abtropfung Reexamined. *Am J Dermatopathol* 1998;20(2):135-139.
66. Fullen DR, Reed JA, Finnerty B, McNutt NS. S100A6 preferentially labels type C nevus cells and nevic corpuscles: additional support for Schwannian differentiation of intradermal nevi. *J Cutan Pathol* 2001;28(8):393-9.
67. Grichnik JM, Rhodes AR, Sober AJ. Benign hyperplasia and neoplasias of melanocytes. In: Freedberg IM, Eisen AZ, Wolff K, Austen KF, Goldsmith LA, Katz SI, editors. *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine*. 6<sup>th</sup> ed. New York: McGraw-Hill; 2003. p.881-904.
68. Dawson HA, Atherton DJ, Mayou B. A prospective study of congenital melanocytic naevi: progress report and evaluation after 6 years. *Br J Dermatol* 1996;134(4):617-23.
69. Marghoob AA, Dusza S, Oliveira S, Halpern AC. Number of satellite nevi as a correlate for neurocutaneous melanocytosis in patients with large congenital melanocytic nevi. *Arch Dermatol* 2004;140(2):171-5.
70. Gallagher RP, McLean DI. The epidemiology of acquired melanocytic nevi. A brief review. *Dermatol Clin* 1995;13(3):595-603.
71. Rodenas JM, Delgado-Rodriguez M, Farinas-Alvarez C, Herranz MT, Serrano S. Melanocytic nevi and risk of cutaneous malignant melanoma in southern Spain. *Am J Epidemiol* 1997;145(11):1020-9.
72. Carli P, Biggeri A, Giannotti B. Malignant melanoma in Italy: risks associated with common and clinically atypical melanocytic nevi. *J Am Acad Dermatol* 1995;32(5 Pt 1):734-9.

73. Loria D, Matos E. Risk factors for cutaneous melanoma: a case-control study in Argentina. *Int J Dermatol* 2001; 40:108-14.
74. Naeyaert JM, Brochez L. Clinical practice. Dysplastic nevi. *N Engl J Med* 2003;349(23):2233-40.
75. Blessing K. Benign atypical naevi: diagnostic difficulties and continued controversy. *Histopathology* 1999;34(3):189-98.
76. Tripp JM, Kopf AW, Marghoob AA, Bart RS. Management of dysplastic nevi: a survey of fellows of the American Academy of Dermatology. *J Am Acad Dermatol* 2002;46(5):674-82.
77. Ackerman AB. "Dysplastic nevus" syndrome: does a survey make it real? *J Am Acad Dermatol* 2003;48(3):461-3.
78. Spatz A, Barnhill RL. The Spitz tumor 50 years later: revisiting a landmark contribution and unresolved controversy. *J Am Acad Dermatol* 1999;40(2 Pt 1):223-8.
79. Dal Pozzo V, Benelli C, Restano L, Gianotti R, Cesana BM. Clinical review of 247 case records of Spitz nevus (epithelioid cell and/or spindle cell nevus). *Dermatology* 1997;194(1):20-5.
80. Song JY, Kwon JA, Park CJ. A case of Spitz nevus with multiple satellite lesions. *J Am Acad Dermatol* 2005;52(2 Suppl 1):48-50.
81. Brazzelli V, Larizza D, Martinetti M, Martinoli S, Calcaterra V, De Silvestri A, *et al.* Halo nevus, rather than vitiligo, is a typical dermatologic finding of turner's syndrome: clinical, genetic, and immunogenetic study in 72 patients. *J Am Acad Dermatol* 2004;51(3):354-8.
82. de Vijlder HC, Westerhof W, Schreuder GM, de Lange P, Claas FH. Difference in pathogenesis between vitiligo vulgaris and halo nevi associated with vitiligo is supported by an HLA association study. *Pigment Cell Res* 2004;17(3):270-4.
83. Schallreuter KU, Kothari S, Elwary S, Rokos H, Hasse S, Panske A. Molecular evidence that halo in Sutton's naevus is not vitiligo. *Arch Dermatol Res* 2003;295(6):223-8.

84. Baranda L, Torres-Alvarez B, Moncada B, Portales-Perez D, de la Fuente H, Layseca E, *et al.* Presence of activated lymphocytes in the peripheral blood of patients with halo nevi. *J Am Acad Dermatol* 1999;41(4):567-72.
85. Kerr OA, Schofield O. Halo congenital nevus. *Pediatr Dermatol* 2003;20(6):541-2.
86. Causeret AS, Skowron F, Viallard AM, Balme B, Thomas L. Subungual blue nevus. *J Am Acad Dermatol* 2003;49(2):310-2.
87. Gonzalez-Campora R, Galera-Davidson H, Vazquez-Ramirez FJ, Diaz-Cano S. Blue nevus: classical types and new related entities. A differential diagnostic review. *Pathol Res Pract* 1994;190(6):627-35.
88. Munoz C, Quintero A, Sanchez JL, Ruiz-Santiago H. Persistent blue nevus simulating melanoma. *J Am Acad Dermatol* 2004;50(5 Suppl):S118-20.
89. Scolyer RA, Zhuang L, Palmer AA, Thompson JF, McCarthy SW. Combined naevus: a benign lesion frequently misdiagnosed both clinically and pathologically as melanoma. *Pathology* 2004;36(5):419-27.
90. de Giorgi V, Massi D, Salvini C, Trez E, Mannone F, Carli P. Dermoscopic features of combined melanocytic nevi. *J Cutan Pathol* 2004;31(9):600-4.
91. Kaur TD, Kanwar AJ. Giant nevus spilus and centrofacial lentiginosis. *Pediatr Dermatol* 2004;21(4):516-7.
92. Cohen LM. Nevus spilus: congenital or acquired? *Arch Dermatol* 2001;137(2):215-6.
93. Thompson JF, Scolyer RA, Kefford RF. Cutaneous melanoma. *Lancet* 2005;365(9460):687-701.
94. Tsao H, Bevona C, Goggins W, Quinn T. The transformation rate of moles (melanocytic nevi) into cutaneous melanoma: a population-based estimate. *Arch Dermatol* 2003;139(3):282-8.
95. Ruiz Lascano A, Kuznitzky R, Cuestas E, Mainardi C, Albertini R, Borello A, *et al.* Risk

- factors for cutaneous melanoma: case-control study in Cordoba, Argentina. *Medicina* 2004;64(6):504-8.
96. Garbe C, Buttner P, Weiss J, Soyer HP, Stocker U, Kruger S, *et al.* Risk factors for developing cutaneous melanoma and criteria for identifying persons at risk: multicenter case-control study of the Central Malignant Melanoma Registry of the German Dermatological Society. *J Invest Dermatol* 1994;102(5):695-9.
97. Katsambas A, Nicolaidou E. Cutaneous malignant melanoma and sun exposure. Recent developments in epidemiology. *Arch Dermatol* 1996;132(4):444-50.
98. Abarca JF, Casiccia CC. Skin cancer and ultraviolet-B radiation under the Antarctic ozone hole: southern Chile, 1987-2000. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2002;18(6):294-302.
99. Hall HI, Miller DR, Rogers JD, Bewerse B. Update on the incidence and mortality from melanoma in the United States. *J Am Acad Dermatol* 1999;40(1):35-42.
100. Martin RC, Robinson E. Cutaneous melanoma in Caucasian New Zealanders: 1995-1999. *ANZ J Surg* 2004;74(4):233-7.
101. Tyler I, Rivers JK, Shoveller JA, Blum A. Melanoma detection in British Columbia, Canada. *J Am Acad Dermatol* 2005;52(1):48-54.
102. Levi F, Te VC, Randimbison L, La Vecchia C. Trends in incidence of various morphologies of malignant melanoma in Vaud and Neuchatel, Switzerland. *Melanoma Res* 2005;15(1):73-5.
103. Tabenkin H, Tamir A, Sperber AD, Shapira M, Shvartzman P. A case-control study of malignant melanoma in Israeli kibbutzim. *Isr Med Assoc J* 1999;1(3):154-7.
104. Balzi D, Carli P, Giannotti B, Paci E, Buiatti E. Cutaneous melanoma in the Florentine area, Italy: incidence, survival and mortality between 1985 and 1994. *Eur J Cancer Prev* 2003;12(1):43-8.

105. Diffey BL. The future incidence of cutaneous melanoma within the UK. *Br J Dermatol* 2004;151(4):868-72.
106. Marks R. Epidemiology of melanoma. *Clin Exp Dermatol* 2000;25(6):459-63.
107. Hall HI, Jamison P, Fulton JP, Clutter G, Roffers S, Parrish P. Reporting cutaneous melanoma to cancer registries in the United States. *J Am Acad Dermatol* 2003;49(4):624-30.
108. Benvenuto-Andrade C, Zen B, Fonseca G, De Villa D, Cestari T. Sun exposure and sun protection habits among high-school adolescents in Porto Alegre, Brazil. *Photochem Photobiol* 2005;81(3):630-5.
109. Criado PR, Vasconcellos C, Sittart JA, Valente NY, Moura BP, Barbosa GL, *et al.* Primary cutaneous malignant melanoma: retrospective study from 1963 to 1997 at Hospital do Servidor Publico Estadual de Sao Paulo. *Rev Assoc Med Bras* 1999;45(2):157-62.
110. Fernandes NC, Calmon R, Maceira JP, Cuzzi T, Silva CSC. Cutaneous melanoma: prospective study of 65 cases. *An Bras Dermatol* 2005;80(1):25-34.
111. INCA. Estimativa 2005: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; 2004.
112. Zemelman V, Garmendia ML, Kirschbaum A. Malignant melanoma mortality rates in Chile (1988-98). *Int J Dermatol* 2002;41(2):99-103.
113. Remontet L, Esteve J, Bouvier AM, Grosclaude P, Launoy G, Menegoz F, *et al.* Cancer incidence and mortality in France over the period 1978-2000. *Rev Epidemiol Sante Publique* 2003;51(1 Pt 1):3-30.
114. Moreno V, Gonzalez J, Soler M, Bosch F, Kogevinas M, Borrás J. Cancer incidence estimation in Spain: period 1993-1996. *Gac Sanit* 2001;15(5):380-8.
115. de Vries E, van de Poll-Franse LV, Louwman WJ, de Gruijl FR, Coebergh JW. Predictions of skin cancer incidence in the Netherlands up to 2015. *Br J Dermatol* 2005;152(3):481-8.
116. Koh D, Wang H, Lee J, Chia KS, Lee HP, Goh CL. Basal cell carcinoma, squamous

cell carcinoma and melanoma of the skin: analysis of the Singapore Cancer Registry data 1968-97. *Br J Dermatol* 2003;148(6):1161-6.

117. Vazquez-Botet M, Latoni D, Sanchez JL. Malignant melanoma in Puerto Rico. *Bol Asoc Med P R* 1990;82(10):454-7.

118. Bergfelt L, Newell GR, Sider JG, Kripke ML. Incidence and anatomic distribution of cutaneous melanoma among United States Hispanics. *J Surg Oncol* 1989;40(4):222-6.

119. Nair MK, Varghese C, Mahadevan S, Cherian T, Joseph F. Cutaneous malignant melanoma--clinical epidemiology and survival. *J Indian Med Assoc* 1998;96(1):19-20, 28.

120. al-Shlash S, al-Shareef Z, Jaber K, al Hoquail, Somorin A. Cutaneous malignant melanoma: Tabuk experience. *Afr J Med Med Sci* 1998;27(1-2):85-8.

121. Pitche P, Napo-Koura, Kpodzro K, Tchangai-Walla K. Melanoma in Togo. A retrospective study over 20 years. *Ann Dermatol Venereol* 1996;123(12):786-8.

122. Diomande MI, Effi AB, Honde M, D'Horpock F, Koffi K, Boka BM, *et al.* Malignant melanoma in the Ivory Coast. Epidemiologic and histo-prognostic aspects. Report of 195 cases. *Clin Exp Pathol* 1999;47(2):92-5.

123. Maia M, Russo C, Ferrari N, Jorge D, Pinheiro MCSA, Muller H, *et al.* Relação entre o nevo melanocítico congênito pequeno e melanoma cutâneo. *An Bras Dermatol* 2003; 78(2):189-95

124. Carvalho BCA; Cunha ME; Giugliani R; Bakos L; Ashton-Prolla P. Melanoma hereditário: prevalência de fatores de risco em um grupo de pacientes no Sul do Brasil. *An Bras Dermatol* 2004;79:53-60.

125. Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS, Pasquini P, Picconi O, Boyle P, *et al.* Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: II. Sun exposure. *Eur J Cancer* 2005;41(1):45-60.



126. Kaddu S, Smolle J, Zenahlik P, Hofmann-Wellenhof R, Kerl H. Melanoma with benign melanocytic naevus components: reappraisal of clinicopathological features and prognosis. *Melanoma Res* 2002;12(3):271-8.
127. Ka VS, Dusza SW, Halpern AC, Marghoob AA. The association between large congenital melanocytic naevi and cutaneous melanoma: preliminary findings from an Internet-based registry of 379 patients. *Melanoma Res* 2005;15(1):61-7.
128. Tromberg J, Bauer B, Benvenuto-Andrade C, Marghoob AA. Congenital melanocytic nevi needing treatment. *Dermatol Ther* 2005;18(2):136-50.
129. Bett BJ. Large or multiple congenital melanocytic nevi: occurrence of cutaneous melanoma in 1008 persons. *J Am Acad Dermatol* 2005;52(5):793-7.
130. Egan CL, Oliveria SA, Elenitsas R, Hanson J, Halpern AC. Cutaneous melanoma risk and phenotypic changes in large congenital nevi: a follow-up study of 46 patients. *J Am Acad Dermatol* 1998;39(6):923-32.
131. Hale EK, Stein J, Ben-Porat L, Panageas KS, Eichenbaum MS, Marghoob AA, Association of melanoma and neurocutaneous melanocytosis with large congenital melanocytic naevi-results from the NYU-LCMN registry. *Br J Dermatol* 2005;152(3):512-7.
132. Soares de Sa BC, Rezze GG, Scramim AP, Landman G, Neves RI. Cutaneous melanoma in childhood and adolescence: retrospective study of 32 patient. *Melanoma Res* 2004;14(6):487-92.
133. Sahin S, Levin L, Kopf AW, Rao BK, Triola M, Koenig K, *et al.* Risk of melanoma in medium-sized congenital melanocytic nevi: a follow-up study. *J Am Acad Dermatol* 1998;39(3):428-33.
134. Rhodes AR, Sober AJ, Day CL, Melski JW, Mihm MC Jr, Fitzpatrick TB  
The malignant potential of small congenital nevocellular nevi. An estimate of association based on a histologic study of 234 primary cutaneous melanomas. *J Am Acad Dermatol* 1982;6(2):230-41.

135. Kruger S, Garbe C, Buttner P, Stadler R, Guggenmoos-Holzmann I, Orfanos CE. Epidemiologic evidence for the role of melanocytic nevi as risk markers and direct precursors of cutaneous malignant melanoma. Results of a case control study in melanoma patients and nonmelanoma control subjects. *J Am Acad Dermatol* 1992;26(6):920-6.
136. Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS, Pasquini P, Abeni D, Boyle P, *et al.* Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: I. Common and atypical naevi. *Eur J Cancer* 2005;41(1):28-44.
137. Tucker MA, Halpern A, Holly EA, Hartge P, Elder DE, Sagebiel RW, *et al.* Clinically recognized dysplastic nevi. A central risk factor for cutaneous melanoma. *JAMA* 1997;277(18):1439-44.
138. Runger TM. Ultraviolet light. In: Bologna JL, Jorizzo JL, Rapini RP, editors. *Dermatology*. 1<sup>st</sup> ed. London: Mosby; 2003. p. 1353-64.
139. Kirchoff VWJH, editor. *Ozônio e radiação UVB*. 1<sup>a</sup>ed. São José dos Campos: Transtec; 1995. p. 1-49.
140. Hawk JLM, Young AR, Ferguson J. Cutaneous photobiology. In: Burns T, Breathnach S, Cox N, Griffiths C, editors. *Rook's Textbook of Dermatology*. 7<sup>th</sup> ed. Oxford: Blackwell Publishing; 2005. p. 24.1-24.
141. Trautinger F. Mechanisms of photodamage of the skin and its functional consequences for skin ageing. *Clin Exp Dermatol* 2001;26(7):573-7.
142. Schieke SM, Schroeder P, Krutmann J. Cutaneous effects of infrared radiation: from clinical observations to molecular response mechanisms. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2003;19(5):228-34.
143. Kadakaro AL, Kavanagh RJ, Wakamatsu K, Ito S, Pipitone MA, Abdel-Malek ZA. Cutaneous photobiology. The melanocyte vs. the sun: who will win the final round? *Pigment Cell Res* 2003;16(5):434-47.

144. Clydesdale GJ, Dandie GW, Muller HK. Ultraviolet light induced injury: immunological and inflammatory effects. *Immunol Cell Biol* 2001;79(6):547-68.
145. Yarosh DB. DNA repair, immunosuppression, and skin cancer. *Cutis* 2004;74(5):10-3.
146. Byrne SN, Halliday GM. B cells activated in lymph nodes in response to ultraviolet irradiation or by interleukin-10 inhibit dendritic cell induction of immunity. *J Invest Dermatol* 2005;124(3):570-8.
147. Cestari TF, Kripke ML, Baptista PL, Bakos L, Bucana CD. Ultraviolet radiation decreases the granulomatous response to lepromin in humans. *J Invest Dermatol* 1995;105(1):8-13.
148. Kolgen W, van Meurs M, Jongsma M, van Weelden H, Bruijnzeel-Koomen CA, Knol EF, *et al.* Differential expression of cytokines in UV-B-exposed skin of patients with polymorphous light eruption: correlation with Langerhans cell migration and immunosuppression. *Arch Dermatol* 2004;140(3):295-302.
149. Granstein RD, Matsui MS. UV radiation-induced immunosuppression and skin cancer. *Cutis* 2004;74(5):4-9.
150. Hofmann-Wellenhof R, Smolle J, Roschger A, Strunk D, Hubmer M, Hoffmann C, *et al.* Sunburn cell formation, dendritic cell migration, and immunomodulatory factor production after solar-simulated irradiation of sunscreen-treated human skin explants in vitro. *J Invest Dermatol* 2004;123(4):781-7.
151. Woods GM, Malley RC, Muller HK. The skin immune system and the challenge of tumour immunosurveillance. *Eur J Dermatol* 2005;15(2):63-9.
152. Aubin F. Mechanisms involved in ultraviolet light-induced immunosuppression. *Eur J Dermatol* 2003;13(6):515-23.
153. Lehmann B, Sauter W, Knuschke P, Dressler S, Meurer M. Demonstration of UVB-induced synthesis of 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 (calcitriol) in human skin by microdialysis. *Arch Dermatol Res* 2003;295(1):24-8.

154. Nishigori C, Hattori Y, Arima Y, Miyachi Y. Photoaging and oxidative stress. *Exp Dermatol* 2003;12(2):18-21.
155. Marks R, editor. Sun and the skin. 1<sup>st</sup> ed. London: Martin Dunitz Ltd; 1995. p. 1-89
156. Sander CS, Chang H, Salzmann S, Müller CSL, Ekanayake-Mudiyanselage S, Elsner P, *et al.* Photoaging is associated with protein oxidation in human skin *in vivo*. *J Invest Dermatol* 2002; 118(4):618-25.
157. Fisher GJ, Kang S, Varani J, Bata-Ksorgo Z, Wan Y, Datta S, *et al.* Mechanisms of photoaging and chronological skin aging. *Arch Dermatol* 2002; 138:1462-70.
158. Berneburg M, Plettenberg H, Medve-Konig K, Pfahlberg A, Gers-Barlag H, Geffeler O, *et al.* induction of the photoaged-associated mitochondrial common deletion *in vivo* in normal human skin. *J Invest Dermatol* 2004; 122:1277-83.
159. Alam M, Ratner D, Cutaneous squamous-cell carcinoma. *J Am Acad Dermatol* 2000; 344(13):975-83.
160. Hussein MR. Ultraviolet radiation and skin cancer: molecular mechanisms. *J Cutan Pathol* 2005;32(3):191-205.
161. Ichihashi M, Ueda M, Budiyo A, Bito T, Oka M, Fukunaga M, *et al.* UV-induced skin damage. *Toxicology* 2003;189(1-2):21-39.
162. Kulms D, Schwarz T. Molecular mechanisms of UV-induced apoptosis. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2000;16(5):195-201.
163. Gilchrist BA, Eller MS, Geller AC, Yaar M. The pathogenesis of melanoma induced by ultraviolet radiation. *N Engl J Med* 1999; 340(17):1341-8.
164. Larsson P, Andersson E, Johansson U, Ollinger K, Rosdahl I. Ultraviolet A and B affect human melanocytes and keratinocytes differently. A study of oxidative alterations and apoptosis. *Exp Dermatol* 2005;14(2):117-23.
165. Tronnier M, Rudolph P, Koser T, Raasch B, Brinckmann J. One single erythemagenic UV irradiation is more effective in increasing the proliferative activity of melanocytes in

- melanocytic naevi compared with fractionally applied high doses. *Br J Dermatol* 1997;137(4):534-9.
166. Bruckner-Tuderman L. Biology of the extracellular matrix. In: Bologna JL, Jorizzo JL, Rapini RP, editors. *Dermatology*. 1<sup>st</sup> ed. London: Mosby; 2003. p. 1483-96.
167. Mcgrath JA, Eady RAJ, Pope FM. Anatomy and organization of human skin. In: Burns T, Breathnach S, Cox N, Griffiths C, editors. *Rook's Textbook of Dermatology*. 7<sup>th</sup> ed. Oxford: Blackwell Publishing; 2005. p. 3.1-84.
168. Tran KT, Griffith L, Wells A. Extracellular matrix signaling through growth factor receptors during wound healing. *Wound Repair Regen* 2004;12(3):262-8.
169. Tiedemann K, Sasaki T, Gustafsson E, Gohring W, Batge B, Notbohm H, *et al*. Microfibrils at basement membrane zones interact with perlecan via fibrillin-1. *J Biol Chem* 2005;280(12):11404-12.
170. Chebassier N, El Houssein O, Viegas I, Dreno B. In vitro induction of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 expression in keratinocytes by boron and manganese. *Exp Dermatol* 2004;13(8):484-90.
171. Nagase H, Woessner JF Jr. Matrix Metalloproteinases. *J Biol Chem* 1999;274:21491-4.
172. Pozo P, Valenzuela MA, Melej C, Zaldivar M, Puente J, Martinez B, *et al*. Longitudinal analysis of metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases and clinical parameters in gingival crevicular fluid from periodontitis-affected patients. *J Periodontal Res* 2005;40(3):199-207.
173. Gillard JA, Reed MW, Buttle D, Cross SS, Brown NJ. Matrix metalloproteinase activity and immunohistochemical profile of matrix metalloproteinase-2 and -9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 during human dermal wound healing. *Wound Repair Regen* 2004;12(3):295-304.
174. Namba M, Asano K, Kanai K, Kyo Y, Watanabe S, Hisamitsu T, *et al*. Suppression of

matrix metalloproteinase production from nasal fibroblasts by fluticasone propionate in vitro. *Acta Otolaryngol* 2004;124(8):964-9.

175. Lateef H, Stevens MJ, Varani J. All-trans-retinoic acid suppresses matrix metalloproteinase activity and increases collagen synthesis in diabetic human skin in organ culture. *Am J Pathol* 2004;165(1):167-74.

176. Goffin JR, Anderson IC, Supko JG, Eder JP Jr, Shapiro GI, Lynch TJ, *et al.* Phase I trial of the matrix metalloproteinase inhibitor marimastat combined with carboplatin and paclitaxel in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2005;11(9):3417-24.

177. Kobayashi T, Hattori S, Shinkai H. Matrix metalloproteinases-2 and -9 are secreted from human fibroblasts. *Acta Derm Venereol* 2003;83(2):105-7.

178. Murphy G, Knauper V, Atkinson S, Butler G, English W, Hutton M, *et al.* Matrix metalloproteinases in arthritic disease. *Arthritis Res* 2002;4 Suppl 3:S39-49.

179. Saunders WB, Bayless KJ, Davis GE. MMP-1 activation by serine proteases and MMP-10 induces human capillary tubular network collapse and regression in 3D collagen matrices. *J Cell Sci* 2005;118(10):2325-40.

180. Skrzydlewska E, Sulkowska M, Koda M, Sulkowski S. Proteolytic-antiproteolytic balance and its regulation in carcinogenesis. *World J Gastroenterol* 2005;11(9):1251-66.

181. 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;202(4):403-11.

182. Okamoto T, Akuta T, Tamura F, van Der Vliet A, Akaike T. Molecular mechanism for activation and regulation of matrix metalloproteinases during bacterial infections and respiratory inflammation. *Biol Chem* 2004;385(11):997-1006.

183. Hofmann UB, Westphal JR, Waas ET, Zendman AJ, Cornelissen IM, Ruiters DJ, *et al.*

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.

184. Disponível em: URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispmim.cgi?id=120360>

185. 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.

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

187. Hibbs MS. Expression of 92 kDa phagocyte gelatinase by inflammatory and connective tissue cells. *Matrix Suppl* 1992;1:51-7.

188. Chu SC, Hu DN, Yang SF, Yang PY, Hsieh YS, Huang SM, *et al.* Uveal melanocytes produce matrix metalloproteinases-2 and -9 in vitro. *Pigment Cell Res* 2004;17(6):636-42.

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

190. Bjorklund M, Koivunen E. Gelatinase-mediated migration and invasion of cancer cells. *Biochim Biophys Acta* 2005;1755(1):37-69.

191. Esparza J, Vilardell C, Calvo J, Juan M, Vives J, Urbano-Marquez A, *et al.* Fibronectin upregulates gelatinase B (MMP-9) and induces coordinated expression of gelatinase A (MMP-2) and its activator MT1-MMP (MMP-14) by human T lymphocyte cell lines. A process repressed through RAS/MAP kinase signaling pathways. *Blood* 1999;94(8):2754-66.

192. Canavesi M, Baldini N, Leonardi A, Sironi G, Bellosta S, Bernini F. In vitro inhibitory effect of lercanidipine on cholesterol accumulation and matrix metalloproteinases secretion by macrophages. *J Cardiovasc Pharmacol* 2004;44(4):416-22.
193. Honda S, Migita K, Hirai Y, Origuchi T, Yamasaki S, Kamachi M, *et al.* Expression of membrane-type 1 matrix metalloproteinase in rheumatoid synovial cells. *Clin Exp Immunol* 2001;126(1):131-6.
194. Martin-Chouly CA, Astier A, Jacob C, Pruniaux MP, Bertrand C, Lagente V. Modulation of matrix metalloproteinase production from human lung fibroblasts by type 4 phosphodiesterase inhibitors. *Life Sci* 2004;75(7):823-40.
195. Han YP, Tuan TL, Hughes M, Wu H, Garner WL. Transforming growth factor-beta - and tumor necrosis factor-alpha -mediated induction and proteolytic activation of MMP-9 in human skin. *J Biol Chem* 2001;276(25):22341-50.
196. Han YP, Nien YD, Garner WL. Tumor necrosis factor-alpha-induced proteolytic activation of pro-matrix metalloproteinase-9 by human skin is controlled by down-regulating tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and mediated by tissue-associated chymotrypsin-like proteinase. *J Biol Chem* 2002;277(30):27319-27.
197. Stuelten CH, Byfield SD, Arany PR, Karpova TS, Stetler-Stevenson WG, Roberts AB. Breast cancer cells induce stromal fibroblasts to express MMP-9 via secretion of TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$ . *J Cell Sci* 2005;118(Pt 10):2143-53.
198. Kobayashi T, Shinkai H. Leptomycin B reduces matrix metalloproteinase-9 expression and suppresses cutaneous inflammation. *J Invest Dermatol* 2005;124(2):331-7.
199. Banerji A, Chakraborti J, Mitra A, Chatterjee A. Cell membrane-associated MT1-MMP-dependent activation of pro-MMP-2 in A375 melanoma cells. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 2005;24(1):3-17.
200. Rosario HS, Waldo SW, Becker SA, Schmid-Schonbein GW. Pancreatic trypsin



increases matrix metalloproteinase-9 accumulation and activation during acute intestinal ischemia-reperfusion in the rat. *Am J Pathol* 2004;164(5):1707-16.

201. Murphy G, Houbrechts A, Cockett MI, Williamson RA, O'Shea M, Docherty AJ. The N-terminal domain of tissue inhibitor of metalloproteinases retains metalloproteinase inhibitory activity. *Biochemistry* 1991;30(33):8097-102.

202. Kobayashi T, Hattori S, Nagai Y, Sakuraoka K, Nishikawa T. Secretion of different types of gelatinases from cultured human keratinocytes. *J Dermatol* 1997;24(4):213-6.

203. Hirota A, Ebihara T, Kusubata M, Kobayashi M, Kobayashi K, Kuwaba K, *et al.* Collagen of chronically inflamed skin is over-modified and upregulates secretion of matrix metalloproteinase 2 and matrix-degrading enzymes by endothelial cells and fibroblasts. *J Invest Dermatol* 2003;121(6):1317-25.

204. Arkell J, Jackson CJ. Constitutive secretion of MMP9 by early-passage cultured human endothelial cells. *Cell Biochem Funct* 2003;21(4):381-6.

205. Bizik J, Bessou S, Felnerova D, Vaheri A, Taieb A. The proteolytic potential of normal human melanocytes: comparison with other skin cells and melanoma cell lines. *Pigment Cell Res* 1996;9(5):255-64.

206. Lei TC, Vieira WD, Hearing VJ. In vitro migration of melanoblasts requires matrix metalloproteinase-2: implications to vitiligo therapy by photochemotherapy. *Pigment Cell Res* 2002;15(6):426-32.

207. Elshaw SR, Sisley K, Cross N, Murray AK, MacNeil SM, Wagner M, *et al.* A comparison of ocular melanocyte and uveal melanoma cell invasion and the implication of alpha1beta1, alpha4beta1 and alpha6beta1 integrins. *Br J Ophthalmol* 2001;85(6):732-8.

208. Gaiotto MA, Focchi J, Ribalta JL, Stavale JN, Baracat EC, Lima GR, *et al.* Comparative study of MMP-2 (matrix metalloproteinase 2) immune expression in normal uterine cervix, intraepithelial neoplasias, and squamous cells cervical carcinoma. *Am J Obstet Gynecol* 2004;190(5):1278-82.

209. Ondo K, Sugio K, Yamazaki K, Yamaguchi M, Yano T, Yoshino I, *et al.* The significance of serum active matrix metalloproteinase-9 in patients with non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2004;46(2):205-13.
210. Yamamoto H, Vinitketkumnien A, Adachi Y, Taniguchi H, Hirata T, Miyamoto N, *et al.* Association of matrilysin-2 (MMP-26) expression with tumor progression and activation of MMP-9 in esophageal squamous cell carcinoma. *Carcinogenesis* 2004;25(12):2353-60.
211. Lin SY, Wang YY, Sheu WH. Preoperative plasma concentrations of vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinase 9 are associated with stage progression in papillary thyroid cancer. *Clin Endocrinol* 2003;58(4):513-8.
212. Liu WW, Zeng ZY, Wu QL, Hou JH, Chen YY. Overexpression of MMP-2 in laryngeal squamous cell carcinoma: a potential indicator for poor prognosis. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2005;132(3):395-400.
213. Mook OR, Frederiks WM, Van Noorden CJ. The role of gelatinases in colorectal cancer progression and metastasis. *Biochim Biophys Acta* 2004;1705(2):69-89.
214. Kachra Z, Beaulieu E, Delbecchi L, Mousseau N, Berthelet F, Moumdjian R, *et al.* Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in human brain tumors. *Clin Exp Metastasis* 1999;17(7):555-66.
215. Giannelli G, Erriquez R, Iannone F, Marinosci F, Lapadula G, Antonaci S. MMP-2, MMP-9, TIMP-1 and TIMP-2 levels in patients with rheumatoid arthritis and psoriatic arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 2004;22(3):335-8.
216. Saito S, Trovato MJ, You R, Lal BK, Fasehun F, Padberg FT Jr, *et al.* Role of matrix metalloproteinases 1, 2, and 9 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 in chronic venous insufficiency. *J Vasc Surg* 2001;34(5):930-8.
217. Ulrich D, Hrynyschyn K, Pallua N. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in sera and tissue of patients with Dupuytren's disease. *Plast Reconstr Surg* 2003;112(5):1279-86.

218. Newby AC. Dual role of matrix metalloproteinases (matrixins) in intimal thickening and atherosclerotic plaque rupture. *Physiol Rev* 2005;85(1):1-31.
219. Yazawa N, Kikuchi K, Ihn H, Fujimoto M, Kubo M, Tamaki T, *et al*. Serum levels of tissue inhibitor of metalloproteinases 2 in patients with systemic sclerosis. *J Am Acad Dermatol* 2000;42(1):70-5.
220. Mao JT, Tashkin DP, Belloni PN, Baileyhealy I, Baratelli F, Roth MD. All-trans retinoic acid modulates the balance of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in patients with emphysema. *Chest* 2003;124(5):1724-32.
221. Kossodo S, Wong WR, Simon G, Kochevar IE. Effects of UVR and UVR-induced cytokines on production of extracellular matrix proteins and proteases by dermal fibroblasts cultured in collagen gels%. *Photochem Photobiol* 2004;79(1):86-93.
222. Vacca A, Moretti S, Ribatti D, Pellegrino A, Pimpinelli N, Bianchi B, *et al*. Progression of mycosis fungoides is associated with changes in angiogenesis and expression of the matrix metalloproteinases 2 and 9. *Eur J Cancer* 1997;33(10):1685-92.
223. Kurschat P, Wickenhauser C, Groth W, Krieg T, Mauch C. Identification of activated matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) as the main gelatinolytic enzyme in malignant melanoma by in situ zymography. *J Pathol* 2002;197(2):179-87.
224. Vaisanen A, Tuominen H, Kallioinen M, Turpeenniemi-Hujanen T. Matrix metalloproteinase-2 (72 kD type IV collagenase) expression occurs in the early stage of human melanocytic tumour progression and may have prognostic value. *J Pathol* 1996;180(3):283-9.
225. Ohnishi Y, Tajima S, Ishibashi 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.
226. Giannelli G, Foti C, Marinosci F, Bonamonte D, Antonaci S, Angelini G. Gelatinase expression at positive patch test reactions. *Contact Dermatitis* 2002;46(5):280-5.

227. Kobayashi T, Onoda N, Takagi T, Hori H, Hattori S, Nagai Y, *et al.*  
Immunolocalizations of human gelatinase (type IV collagenase, MMP-9) and TIMP (tissue inhibitor of metalloproteinases) in normal epidermis and some epidermal tumors. *Arch Dermatol Res* 1996;288(5-6):239-44.
228. Kobayashi T, Sakuraoka K, Hattori S, Hori H, Nagai Y, Tajima S, *et al.*  
Immunolocalization of human gelatinase (type IV collagenase, MMP-9) and tissue inhibitor of metalloproteinase 1 in Hailey-Hailey and Darier's diseases. *Dermatology* 1996;193(2):110-4.
229. Ohnishi Y, Tajima S, Akiyama M, Ishibashi A, Kobayashi R, Horii I. Expression of elastin-related proteins and matrix metalloproteinases in actinic elastosis of sun-damaged skin. *Arch Dermatol Res* 2000;292(1):27-31.
230. Feliciani C, Vitullo P, D'orazi G, Palmirotta R, Amerio P, Pour SM, *et al.* The 72-kDa and the 92-kDa gelatinases, but not their inhibitors TIMP-1 and TIMP-2, are expressed in early psoriatic lesions. *Exp Dermatol* 1997;6(6):321-7.
231. Verraes S, Hornebeck W, Polette M, Borradori L, Bernard P. Respective contribution of neutrophil elastase and matrix metalloproteinase 9 in the degradation of BP180 (type XVII collagen) in human bullous pemphigoid. *J Invest Dermatol* 2001;117(5):1091-6.
232. Patroi I, Annessi G, Girolomoni G. Mid-dermal elastolysis: a clinical, histologic, and immunohistochemical study of 11 patients. *J Am Acad Dermatol* 2003;48(6):846-51.
233. Onoue S, Kobayashi T, Takemoto Y, Sasaki I, Shinkai H. Induction of matrix metalloproteinase-9 secretion from human keratinocytes in culture by ultraviolet B irradiation. *J Dermatol Sci* 2003;33(2):105-11.
234. Schnaeker EM, Ossig R, Ludwig T, Dreier R, Oberleithner H, Wilhelmi M, *et al.*  
Microtubule-dependent matrix metalloproteinase-2/matrix metalloproteinase-9 exocytosis: prerequisite in human melanoma cell invasion. *Cancer Res* 2004;64(24):8924-31.

235. Iida J, Wilhelmson KL, Price MA, Wilson CM, Pei D, Furcht LT, *et al.* Membrane type-1 matrix metalloproteinase promotes human melanoma invasion and growth. *J Invest Dermatol* 2004;122(1):167-76.
236. Ntayi C, Hornebeck W, Bernard P. Influence of cultured dermal fibroblasts on human melanoma cell proliferation, matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) expression and invasion in vitro. *Arch Dermatol Res* 2003;295(6):236-41.
237. Gaultier F, Ejeil AL, Igondjo-Tchen S, Dohan D, Dridi SM, Maman L, *et al.* Possible involvement of gelatinase A (MMP2) and gelatinase B (MMP9) in toxic epidermal necrolysis or Stevens-Johnson syndrome. *Arch Dermatol Res* 2004;296(5):220-5.
238. Hofmann UB, Eggert AA, Blass K, Brocker EB, 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(23):8221-5.
239. Paquet P, Nusgens BV, Pierard GE, Lapiere CM. Gelatinases in drug-induced toxic epidermal necrolysis. *Eur J Clin Invest* 1998;28(7):528-32.
240. Snoek-van Beurden PA, Von den Hoff JW. Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Biotechniques* 2005;38(1):73-83.
241. Yan SJ, Blomme EA. In situ zymography: a molecular pathology technique to localize endogenous protease activity in tissue sections. *Vet Pathol* 2003;40(3):227-36.
242. Taylor CR, Shi SR, Barr NJ, Wu N. Techniques of Immunohistochemistry: principles, pitfalls and standardization. In Dabbs DJ, editor. *Diagnostic Immunohistochemistry*. Philadelphia: Chapman and Hall Medical; 2002. p. 3-43.
243. Cerio R, Calonje E. Histopathology of the skin: general principles. In: Burns T, Breathnach S, Cox N, Griffiths C, editors. *Rook's Textbook of Dermatology*. 7<sup>th</sup> ed. Oxford: Blackwell Publishing; 2005. p. 7.1-44.

244. Hsu SM, Raine L. Protein A, avidin, and biotin in immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem* 1981;29(11):1349-53.
245. Hsu SM, Raine L, Fanger H. The use of antiavidin antibody and avidin-biotin-peroxidase complex in immunoperoxidase technics. *Am J Clin Pathol* 1981;75(6):816-21.
246. Bonamigo RR. A expressão imunoistoquímica das metaloproteinases -2 e -9 da matriz na rosácea inflamatória[tese]. Porto Alegre(RS): UFRGS; 2003.
247. Bonamigo RR, Bakos L, Edelweiss M, Cartell A. Could matrix metalloproteinase-9 be a link between Demodex folliculorum and rosacea. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2005, 19(5):646-7.
248. Afonso AA, Sobrin L, Monroy DC, Selzer M, Lokeshwar B, Pflugfelder SC. Tear fluid gelatinase B activity correlates with IL-1alpha concentration and fluorescein clearance in ocular rosacea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40(11):2506-12.
249. Giannelli G, Brassard J, Foti C, Stetler-Stevenson WG, Falk-Marzillier J, Zambonin-Zallone A, Schiraldi O, Quaranta V. Altered expression of basement membrane proteins and their integrin receptors in lichen planus: possible pathogenetic role of gelatinases A and B. *Lab Invest* 1996;74(6):1091-104.
250. Shimanovich I, Mihai S, Oostingh GJ, Ilenchuk TT, Brocker EB, Opdenakker G, *et al.* Granulocyte-derived elastase and gelatinase B are required for dermal-epidermal separation induced by autoantibodies from patients with epidermolysis bullosa acquisita and bullous pemphigoid. *J Pathol* 2004;204(5):519-27.
251. Liu Z, Shipley JM, Vu TH, Zhou X, Diaz LA, Werb Z, *et al.* Gelatinase B-deficient mice are resistant to experimental bullous pemphigoid. *J Exp Med* 1998;188(3):475-82.
252. Venencie PY, Bonnefoy A, Gogly B, Groult N, Kut C, Pellat B, *et al.* Increased expression of gelatinases A and B by skin explants from patients with anetoderma. *Br J Dermatol* 1997;137(4):517-25.
253. Ghomrasseni S, Dridi M, Gogly B, Bonnefoix M, Vabres P, Venencie PY, *et al.*

- Anetoderma: an altered balance between metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases. *Am J Dermatopathol* 2002;24(2):118-29.
254. Weckroth M, Vaheri A, Lauharanta J, Sorsa T, Kontinen YT. Matrix metalloproteinases, gelatinase and collagenase, in chronic leg ulcers. *J Invest Dermatol* 1996;106(5):1119-24
255. Wysocki AB, Staiano-Coico L, Grinnell F. Wound fluid from chronic leg ulcers contains elevated levels of metalloproteinases MMP-2 and MMP-9. *J Invest Dermatol* 1993;101(1):64-8.
256. Yager DR, Zhang LY, Liang HX, Diegelmann RF, Cohen IK. Wound fluids from human pressure ulcers contain elevated matrix metalloproteinase levels and activity compared to surgical wound fluids. *J Invest Dermatol* 1996;107(5):743-8.
257. Tarlton JF, Bailey AJ, Crawford E, Jones D, Moore K, Harding KD. Prognostic value of markers of collagen remodeling in venous ulcers. *Wound Repair Regen* 1999;7(5):347-55.
258. Ladwig GP, Robson MC, Liu R, Kuhn MA, Muir DF, Schultz GS. Ratios of activated matrix metalloproteinase-9 to tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 in wound fluids are inversely correlated with healing of pressure ulcers. *Wound Repair Regen* 2002;10(1):26-37.
259. Neely AN, Clendening CE, Gardner J, Greenhalgh DG, Warden GD. Gelatinase activity in keloids and hypertrophic scars. *Wound Repair Regen* 1999;7(3):166-71.
260. Kerkela E, Saarialho-Kere U. Matrix metalloproteinases in tumor progression: focus on basal and squamous cell skin cancer. *Exp Dermatol* 2003;12(2):109-25.
261. Fundyler O, Khanna M, Smoller BR. Metalloproteinase-2 expression correlates with aggressiveness of cutaneous squamous cell carcinomas. *Mod Pathol* 2004;17(5):496-502.
262. Verdolini R, Amerio P, Goteri G, Bugatti L, Lucarini G, Mannello B, *et al.* Cutaneous carcinomas and preinvasive neoplastic lesions. Role of MMP-2 and MMP-9

metalloproteinases in neoplastic invasion and their relationship with proliferative activity and p53 expression. *J Cutan Pathol* 2001;28(3):120-6.

263. Dumas V, Kanitakis J, Charvat S, Euvrard S, Faure M, Claudy A. Expression of basement membrane antigens and matrix metalloproteinases 2 and 9 in cutaneous basal and squamous cell carcinomas. *Anticancer Res* 1999;19(4B):2929-38.

264. Hofmann UB, Westphal JR, Waas ET, Becker JC, Ruitter DJ, van Muijen GN. Coexpression of integrin alpha(v)beta3 and matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) coincides with MMP-2 activation: correlation with melanoma progression. *J Invest Dermatol* 2000;115(4):625-32.

265. Hofmann UB, Houben R, Brocker EB, Becker JC. Role of matrix metalloproteinases in melanoma cell invasion. *Biochimie* 2005;87(3-4):307-14.

266. Ntayi C, Hornebeck W, Bernard P. Involvement of matrix metalloproteinases (MMPs) in cutaneous melanoma progression. *Pathol Biol* 2004;52(3):154-9.

267. Redondo P, Lloret P, Idoate M, Inoges S. Expression and serum levels of MMP-2 and MMP-9 during human melanoma progression. *Clin Exp Dermatol* 2005; 30:541-5.

268. Siddiqui FA, Siddiqui TF, Francis JL. Hemoglobin induces the production and release of matrix metalloproteinase-9 from human malignant cells. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2003;14(5):449-55.

269. Nguyen M, Arkell J, Jackson CJ. Active and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-free gelatinase B accumulates within human microvascular endothelial vesicles. *J Biol Chem* 1998;273(9):5400-4.

270. Fisher GJ, Datta SC, Talwar HS, Wang ZQ, Varani J, Kang S, *et al.* Molecular basis of sun-induced premature skin ageing and retinoid antagonism. *Nature* 1996;379(6563):335-9.



## 10. ARTIGO EM INGLÊS

**Acute effects of ultraviolet radiation B in immunohistochemical expression of matrix metalloproteinases –2 and –9 in melanocytic nevi**

### **Authors**

Renato Marchiori Bakos, Lucio Bakos, Maria Isabel Albano Edelweiss, André Cartell, José Carlos Mariante, Nathália Costaguta Matas Solés.

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

### **Correspondence**

Renato Marchiori Bakos – Rua Coronel Bordini, 889, CEP 90040-001, Porto Alegre, RS, Brazil. Phone/Fax: +55 51 33319322; e-mail: [renato@clinicabakos.com.br](mailto:renato@clinicabakos.com.br)

## ABSTRACT

**Background:** the incidence of melanoma continues to increase in several countries. Melanocytic nevi may represent precursors or risk indicators of cutaneous melanoma. Ultraviolet radiation is the main environmental risk factor in their development. Studies with irradiated nevi show that ultraviolet B (UVB) radiation can cause morphological and biological alterations similar to those of a melanoma *in situ*. Matrix metalloproteinases (MMP) are proteolytic enzymes, and MMP-2 and -9 (gelatinase A and B) in particular, appear to be involved with tumour invasion, the formation of metastases and neoangiogenesis in melanomas. This study aims to evaluate the effects of UVB radiation on the immunohistochemical expression of MMP-2 and -9 in different cell lines from melanocytic nevi.

**Methods:** one half of each of the forty-two melanocytic nevi used in the study was irradiated with 2 MEDs (Minimal Erythema Dosis) of UVB radiation and excised one week later. Three different observers were given the task of comparing the intensity of the immunohistochemical expression of the MMP -2 and -9 on the irradiated and non-irradiated sides of keratinocytes, melanocytes from the epidermis and upper dermis, endothelial cells and fibroblasts. The collected data were analysed using the paired t test for differences in expression and ICC in order to assess the homogeneity of the evaluations made by the observers.

**Results:** in relation to the expression of MMP-2, all the cell lines showed an increase on the irradiated sides, especially the epidermal melanocytes. Regarding MMP-9, while no significant increase in its expression in keratinocytes was noted on the irradiated side, significant increases were observed in the remaining lines.

**Conclusions:** UVB radiation at 2 MEDs increases the immunohistochemical expression of MMP -2 and -9 in almost all evaluated cell lines up to one week after irradiation, with the exception of MMP-9 in keratinocytes.

**Keywords:** ultraviolet rays, nevi and melanomas, gelatinase A, gelatinase B, photobiology.

## INTRODUCTION

In recent decades, the incidence of melanoma has increased in the white population throughout the world (1-15), and has become a public health problem in some countries (1). Early diagnosis remains the most important factor in dealing with melanoma. Nevertheless, as new studies increase the pool of knowledge available on the mechanisms linked to the emergence of melanomas, tumour invasion and the formation of metastases, therapeutic methods can be improved and even created to deal with them.

It is well known that individual characteristics, such as fair-skinned phototypes, the quantitative presence of acquired melanocytic nevi, the presence of atypical nevi and a family history of melanoma, are the main constitutional factors responsible for their appearance (1, 4, 16, 17).

Melanocytic nevi are benign lesions, derived from melanocytes, and are considered congenital when present at birth or in the first year of life, or acquired when they appear after this age (18). Their presence in large numbers (> 50 nevi) is a significant risk indicator for the appearance of melanoma (18-20). Furthermore, some melanocytic nevi are also considered to be their precursors (2, 21, 22).

Ultraviolet radiation (UVR) is considered the most important environmental risk factor involved in the appearance of melanoma, mainly in the presence of a pattern of intermittent solar exposure and a history of sunburns (23). Experimental studies have shown that melanocytic nevi can undergo morphological and biological alterations, though transitory, when irradiated with two to four minimum erythral doses (MEDs) of ultraviolet B (UVB) radiation, resembling atypical nevi or even simulating melanomas *in situ* (24-26).

Matrix metalloproteinases (MMPs) are a group of proteolytic enzymes that play a role in the process of remodelling and degradation of the extracellular matrix and basal membranes, in both physiological and pathological processes (27-34). More than twenty types of MMPs have been identified, and they are classified, according to their substrates

and functions, into subgroups: collagenases (MMP-1, -8, -12, -13, -18, -19 and -20), gelatinases (MMP-2 and -9), matrylisins (MMP-7 and -26), stromelysins (MMP-3, -10, -11) and the membrane-type metalloproteinases (MMP-14, -15, -16, -17, -24 and -25) (35-37).

Denatured collagen (gelatine) is an important substrate for MMPs -2 and -9, because of which they are also known as gelatinases A and B (38). As they degrade type-IV collagen, the main component of the basal membranes, they have included among their functions, that of participating in the migratory process of tumour cells, tumour invasion of adjacent tissue and, consequently the formation of metastases (37, 39-46).

Several studies have demonstrated that melanomas exhibit increased gelatinase expression, while in melanocytic nevi, such expression is absent or weak (47-53).

Ultraviolet radiation may act as an inductor of gelatinase genes (36). Studies with cultures of keratinocytes and fibroblasts have shown that UVR increases the expression of gelatinase in these cells (54, 55).

Little is known concerning the effect of UVR on the gelatinase expression in melanocytic nevi *in vivo*. The expression of MMP-2 appears to be increased in keratinocytes, but not in melanocytes; although there is a lack of experiments in the literature concerning the *in vivo* behaviour of MMP-9 in irradiated melanocytic nevi (56).

The main objective of the present study was to evaluate the effects of 2 MED of UVB radiation on the expression of gelatinases in melanocytes from melanocytic nevi *in vivo*. The secondary objectives were to evaluate the effects of irradiation on gelatinases expression in other epithelial and upper dermal cell lines that compose the melanocytic nevi, such as keratinocytes, fibroblasts and endothelial cells.

## **MATERIAL AND METHODS**

An experimental study with UVB irradiated melanocytic nevi was performed at the Services of Dermatology and Pathology of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre

(Federal University of Rio Grande do Sul, School of Medicine, Porto Alegre, Brazil). All the biological material used was obtained from the collection of paraffin blocks belonging to the Service of Pathology, having been produced by a previous study, the procedures of which are described below (57).

### **Patients and Irradiation**

The material used came from patients of both sexes, aged over 18 years or under 18 years with the agreement of their parents, that had melanocytic nevi and desired to have them excised. Patients with melanocytic nevi, without clinical evidences of malignancy, with diameter from 5mm to 10mm were included in the sample. Patients with bleeding lesions, presenting signs of secondary infection, with lesions localised on the face, as well as pregnant patients, those with photosensitive diseases, or using potentially photosensitising drugs, or with a history of sun exposure in the last 30 days were excluded from the study.

The study was carried out after the approval from the Research and Ethics Committee of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

The patients, after giving their written informed consent, went through a dermatological examination, in order to select the nevi to be excised. The measurement of the MED was performed in the lower-axillary thoracic region using a standard technique (24). The equipment used was the Psora-comb Dermalight 80 (Dr. K. Hönle GmbH, Munich, Germany), with exposure times varying from 30 to 180 seconds, corresponding to UVB doses between  $15 \text{ mJ/cm}^2$  and  $91.8 \text{ mJ/cm}^2$  with a mode of  $45.9 \text{ mJ/cm}^2$ . The device has two fluorescent lamps that emit a continuous spectrum with a peak emission of 313nm and irradiation intensity of  $5.1 \times 10 \text{ W/cm}^2$  of UVB and  $6.15 \times 10 \text{ W/cm}^2$  of UVA, after 5 minutes of heating, with a rigid loop that maintains the apparatus at a fixed distance from the skin surface.

After 24 hours, the MED was read and registered. Following this, one half of the melanocytic lesion was covered with an opaque, not photo-sensitive tape, and the other half was submitted to 2 MED of irradiation with the same lamp used for its measuring (24, 26,57). One week after the irradiation the, the nevi were excised (24, 26,57).

### **Immunohistochemistry**

The specimens were fixed in 10% buffered formaldehyde, having been submitted to the routine procedures: inclusion in paraffin and cutting in 5 micrometer longitudinal sections, with the purpose of viewing both the irradiated and non-irradiated sides in the same slide, in both slides stained with hematoxylin and eosin (H-E), and in those in which immunohistochemical techniques were employed.

Immunohistochemistry was carried out according to the steps described below, based on the technique of Hsu *et al* (58): (a) Rehydration of the slides (xylol – alcohol – distilled water); (b) antigen recovery with citrate buffer and endogen peroxidase blocking; (c) application of primary antibodies for MMP-2 (Neomarkers Incorporation, Fremont, USA) and MMP-9 (Neomarkers Incorporation, Fremont, USA) and of the secondary antibody associated to the biotin-streptavidin amplification system (Novocastra Laboratories Ltd. – Newcastle, England); (d) application of the diaminobenzidine chromogen solution (DAKO Corporation, Carpinteria, USA) and counterstain with Harris' hematoxylin.

Once the antigen recovery had been accomplished, all steps were preceded by washing in a PBS buffer (sodium chloride, with monobasic sodium phosphate and dibasic sodium phosphate) ( Reagen, Rio de Janeiro, Brazil).

### **Variables**

The histological slides, those coloured with H-E and those in which immunohistochemical techniques were used, were examined by three independent observers. In order to evaluate the expression of metalloproteinases –2 and –9, a semi-quantitative method was used, in which: 0 represented absence of expression; 1+, weak

expression; 2+, moderate expression; and 3+, strong expression. In cases in which there were different degrees of intensity on the same side, the area of highest expression was elected. Gelatinase expression was evaluated in keratinocytes, in epidermal and superficial dermal melanocytes, in endothelial cells and fibroblasts of upper dermis, in both irradiated (IS) and non-irradiated sides (NIS). The mean of the evaluations of the three observers was used as the final score (ISS and NISS) (59).

To morphological alterations of melanocytes and keratinocytes, secondary to irradiation values were also given between 0, when negative, and 3+, according to the presence of atypias, hyperplasia, enlarged nucleus or cytoplasm in the melanocytes and parakeratosis or hyperplasia in the epidermis. The final score consisted also of the mean of the values given by the observers.

### **Statistical analysis**

The data were analysed using the programme SPSS, version 11. The paired T test was used for statistical analysis. The data were considered statistically significant when  $p < 0.05$ . In order to measure the homogeneity of the evaluations between the three observers, the interclass correlation coefficient (ICC) was used. An ICC over 0.7 was considered good, and over 0.4, regular.

### **RESULTS**

Forty-two irradiated melanocytic nevi were analysed. Of these, 6 were junctional; 9, dermal; and 27, compound.

The sections stained by H-E showed that the irradiated side of the nevi presented more morphological alterations of the melanocytes than the non-irradiated side (ISS: 2.08 and NISS: 1.10;  $p < 0.001$ ), as with the keratinocytes (ISS: 1.50 and NISS: 0.79;  $p < 0.001$ ).



In the evaluation of the immunohistochemical expression of MMP-2, the irradiated sides exhibited increased expression in all the cell lines, when compared to the non-irradiated sides. The melanocytes located in the epidermis presented the greatest difference in score (ISS: 1.70, NISS: 1.04;  $p < 0.001$ ), followed by dermal melanocytes (ISS: 1.32, NISS: 0.94;  $p < 0.001$ ), keratinocytes (ISS: 1.56, NISS: 1.25;  $p < 0.001$ ), endothelial cells (ISS: 1.03, NISS: 0.77;  $p < 0.001$ ) and fibroblasts (ISS: 1.11, NISS: 0.90;  $p < 0.001$ ). (Figure 1)

Regarding the expression of MMP-9, no statistically significant difference was found between the two sides in the keratinocytes (ISS: 2.39, NISS: 2.18;  $p = 0.072$ ). The other cell lines, such as epidermal melanocytes (ISS: 1.83, NISS: 1.40;  $p < 0.001$ ), dermal melanocytes (ISS: 1.67, NISS: 1.44;  $p < 0.001$ ), endothelial cells (ISS: 1.83, NISS: 1.59;  $p < 0.004$ ) and fibroblasts (ISS: 1.79, NISS: 1.56;  $p < 0.012$ ) showed statistically significant score differences on the irradiated sides. (Figure 2)

The ICC showed good to regular rates in most of the study variables, varying from 0.35 to 0.82.

Tables 1 and 2 respectively, show the data from the immunohistochemical expression of the MMP-2 and -9 on the irradiated and non-irradiated sides, containing mean score, standard deviation, median, ICC, as well as the statistical analysis of each of the variables studied.

Figures 3 and 4 demonstrate, respectively, higher expression of MMP-2 in keratinocytes and epidermal melanocytes on irradiated, compared to non-irradiated side. Figure 5 shows higher expression of MMP-9 in endothelial cells and fibroblasts, on irradiated side.

## **DISCUSSION**

The MMPs -2 and -9 are zinc-dependent proteolytic enzymes that degrade collagen IV and, because of this, are associated with tumour invasion, the formation of metastases and neoangiogenesis in patients with melanoma (34, 52, 60, 61). MMP-2 expression appears to increase with tumour progression, and as such is suggested as a possible prognostic factor in such patients (51). *In vivo*, MMP-9 expression was related to the radial growth phase of the melanoma, being negative in the vertical growth phase, suggesting that its highest expression would be associated to an early phase of tumour invasion (53). Metalloproteinases can be produced by the tumour cells, but also by the stromal cells (34, 47, 48). Both its production and activation are controlled in a balanced way by their natural inhibitors, the tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) (62). In pathological conditions such as melanomas, this equilibrium is commonly lost, accelerating the proteolytic activity and collaborating with the evolution of the disease (34).

Benign melanocytic lesions normally present negative or weakly positive gelatinase expression. In a series of 25 lesions, Simonetti *et al* observed weak to moderate immunohistochemical expressions of MMP-2 in compound melanocytic nevi, mainly in the papillary dermal nests. In junctional nevi, the intensity was more prominent in cells located at the dermal-epidermal junction. Dysplastic nevi and compound nevi with atypias had slightly higher expression levels than the other nevi (52). In another study, Vaisanen *et al* observed that junctional and dermal nevus cells expressed MMP-2, and that in case of greater architectural disruption or in the presence of atypias, the expression increased (51). MMP-9 expression was negative in all these nevi. Two further studies that assessed the immunohistochemical expression of MMP-9 in melanocytic nevi, did not observe any expression (52, 53).

Ultraviolet B radiation may be one of the inducers of gelatinase expression in tissue (30, 36, 54, 55, 63, 64). The exact mechanism by which this occurs is not fully understood, though it is known that this radiation stimulates transcriptional factors such as AP-1 and

NF- kappa B and of interleukins that participate in the production and secretion of MMP-2 and -9 (30, 63, 65). Both *in vitro* and *in vivo* studies have shown increased expression of MMP-2 and -9 in photo-lesioned skin (30, 54, 55). However, little is known of the effects that it has on gelatinase expression in melanocytic nevi, potential precursors of melanoma.

The present study describes the alterations caused by ultraviolet B radiation at a 2 MED in the immunohistochemical expression of the metalloproteinase-2 and -9 in melanocytic nevi, one week after irradiation. The irradiated sides presented, systematically, more morphological alterations in the keratinocytes and melanocytes, similar to the findings reported by Tronnier *et al* (24-26).

In relation to the immunohistochemical expression of MMP-2, the data revealed that, on the irradiated sides, epidermal and dermal melanocytes, keratinocytes, endothelial cells and fibroblasts presented higher mean expression scores than the non-irradiated sides.

The increased expression of MMP-2, shown by the keratinocytes in melanocytic nevi, has been described previously by Krengel *et al*. These authors evaluated the expression of MMP-2, TIMP-2 and MT1-MMP in 10 irradiated melanocytic nevi with 4 MED of UVB. They reported a weak to moderate expression of MMP-2 in the keratinocytes of 8 nevi before irradiation, and a moderate to strong expression after intervention (56). Other *in vitro* studies have also shown that keratinocytes express MMP-2 (35, 66) and that, *in vivo*, UVB can increase this expression (30).

In their study with 10 nevi, Krengel *et al*, observed no expression of MMP-2 in melanocytes, either before or after irradiation of the lesions (56). In the evaluated melanocytes, there was an increase in MMP-2 expression on the irradiated side. *In vitro* studies have demonstrated that melanocytes can constitutionally produce MMP-2 (67, 68). Furthermore, Wu *et al* noted that melanocytes in cultures expressed MMP-2 and that this expression increased following irradiation with UVB (69). Gontier *et al*, using zymography

and Western blotting, found that dermal nevi cells produce MMP-2, though, only in an inactivated form (70). These studies may perhaps give support to the findings of the present study, which showed an increase in the expression of MMP-2 in both epidermal and superficial dermal irradiated melanocytes. The lower difference in the final scores between irradiated and non-irradiated sides found in dermal melanocytes, comparing to epidermal, may be due to the fact that UVB affects less the dermis than the dermo-epidermal junction.

MMP-2 can also be secreted by endothelial cells (71-73). In cultures of these cells, VEGF (vascular endothelial growth factor) and collagen extracted from skin with chronic inflammation have been identified as stimulators of MMP-2 expression (74, 75). In a study using *in situ* hybridisation, endothelial cells presented signs of RNAm MMP-2 (54). No previous study was found that described an increase in the immunohistochemical expression of MMP-2 in endothelial cells from the upper dermis of irradiated melanocytic nevi, as reported in the present study.

In fibroblasts, MMP-2 is secreted constitutionally (35). In them, Ultraviolet B radiation has been described as stimulating MMP-2 expression (35, 76). Ohnishi *et al*, using Northern blot, demonstrated that fibroblasts, located in the upper dermis of photo-lesioned skin, had higher levels of RNAm MMP-2 than controls (77). Recently, Kossodo *et al*, in an *in vitro* study, failed to detect any increase in MMP-2 expression in fibroblasts irradiated with UVB (78). The data from the present study indicate a statistically significant difference in the immunohistochemical expression of MMP-2 in fibroblasts in the irradiated side, though it was the lowest found within the evaluated cell lines.

Epidermal and upper dermal melanocytes, endothelial cells and fibroblasts presented mean scores of expression of MMP-9 higher on the irradiated side. However, keratinocytes did not show statistically significant difference between the scores of the two sides.

In normal skin, the immunohistochemical expression of MMP-9 has been demonstrated (79). *In vitro*, it can be secreted constitutionally by keratinocytes (35). In cell cultures of keratinocytes, ultraviolet radiation increased this type of expression (55, 69). MMP-9 can activate cytokines, such as TGF- $\beta$ , TNF and IL-1, through their pro-forms and, thus, stimulate its own secretion by keratinocytes by means of an autocrine mechanism (80). In this study, no statistically significant difference was detected between the immunohistochemical expression of MMP-9 in keratinocytes from the two sides. It is possible that a phenomenon similar to the autocrine mechanism described above may have occurred following irradiation. Thus, MMP-9 expressed on the irradiated side, could have possibly stimulated directly the non-irradiated side.

Two earlier studies that evaluated the immunohistochemical expression of MMP-9 in melanocytes of non-irradiated melanocytic nevi, failed to show immunoreaction in the sections (52, 53). However, this did not occur in the present study, which is the first to evaluate and demonstrate, *in vivo*, an increase in the immunohistochemical expression of MMP-9 in melanocytes from melanocytic nevi irradiated with UVB. The possibility that normal melanocytes may be capable of secreting MMP-9 has been demonstrated, *in vitro*, with cultures of melanocytes (67).

Latent forms of MMP-9 can be found in endothelial cell cultures from the dermal microvasculature (81). Moreover, in an *in vitro* study, it was found that endothelial cells can even store activated forms of MMP-9 for immediate secretion, which would facilitate their migration during the angiogenic process (82). An *in vivo* experiment with scar tissue revealed immunohistochemical expression of MMP-9 in these cells (28). The data from the present sample showed that UVB can increase the immunohistochemical expression of MMP-9, *in vivo*, in endothelial cells from the upper dermis of melanocytic nevi.

Zymography has been used to demonstrate that fibroblasts can secrete MMP-9, when stimulated by cytokines (TGF- $\beta$ 1 and TNF- $\alpha$ ) (35, 83). In culture medium, the

expression of MMP-9 in fibroblasts also increased when they were irradiated with UVB (76). In scar tissue, fibroblasts express MMP-9 immunohistochemically (28). The data from the present sample showed that, *in vivo*, when stimulated by UVB radiation, the fibroblasts from the upper dermis of melanocytic nevi can have an increase in the immunohistochemical expression of MMP-9.

The increase in the immunohistochemical expression of MMP-2 and MMP-9 on the irradiated sides of melanocytic nevi suggests that a single application of 2 MED of UVB can modify the expression of gelatinases *in vivo*, up to one week after the irradiation of the lesion, with exception of MMP-9 in keratinocytes. The irradiated epidermal melanocytes present in the melanocytic nevi showed the highest increase in MMPs –2 and –9. The cell lines present in the dermis (melanocytes, dermal cells, fibroblasts, and endothelial cells) also presented increased expression on the irradiated sides, though with lower differences between the scores, perhaps due the reduced penetration of the UVB radiation at those levels and the scarce quantity of UVA emitted by the lamp. A possible explanation for the difference between the expression scores of MMP-2, found in the irradiated keratinocytes being similar to that of the dermal cells, and for the difference in the MMP-9 in the keratinocytes failing to reach statistical significance, may be related to the autocrine alimentionation phenomena that the MMPs perform in keratinocytes. Thus, hypothetically, the expression of gelatinases on the irradiated side could influence the expression on the non-irradiated side, therefore diminishing those differences (80, 84).

By establishing the mean score of the three observers, the chance of a bias in the reading of the slides was reduced. The ICC rates were considered good to regular in most variables; though some had a low response homogeneity, a fact that suggest a limitation of the immunohistochemical method in the evaluation of MMP expression in tissue from melanocytic nevi.

Further research, using zymography, which differentiates the active and inactive forms of gelatinase would perhaps contribute to the better understanding of the possible roles played by metalloproteinases-2 and -9 present in the nevi after irradiation with UVB, in the possible transformation of nevi into melanomas, and perhaps bringing some light on the poorly understood mechanisms of development and invasion of these neoplasms.

### **Acknowledgements**

We are grateful to Dr. José Carlos Mariante for permitting the use of the biological material from his study; the biologist Ivana Höfke de Souza Gallota for her assistance with the immunohistochemical techniques; to Dr. Mário Bernardes Wagner for his assistance with the statistical analyses of the data; to Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for the financial assistance given in the form of a post-graduate study grant (Master Degree);

**REFERENCES**

1. Thompson JF, Scolyer RA, Kefford RF. Cutaneous melanoma. *Lancet* 2005;365(9460):687-701.
2. Tsao H, Bevona C, Goggins W, Quinn T. The transformation rate of moles (melanocytic nevi) into cutaneous melanoma: a population-based estimate. *Arch Dermatol* 2003;139(3):282-8.
3. Ruiz Lascano A, Kuznitsky R, Cuestas E, Mainardi C, Albertini R, Borello A, *et al.* Risk factors for cutaneous melanoma: case-control study in Cordoba, Argentina. *Medicina* 2004;64(6):504-8.
4. Garbe C, Buttner P, Weiss J, Soyer HP, Stocker U, Kruger S, *et al.* Risk factors for developing cutaneous melanoma and criteria for identifying persons at risk: multicenter case-control study of the Central Malignant Melanoma Registry of the German Dermatological Society. *J Invest Dermatol* 1994;102(5):695-9.
5. Katsambas A, Nicolaidou E. Cutaneous malignant melanoma and sun exposure. Recent developments in epidemiology. *Arch Dermatol* 1996;132(4):444-50.
6. Rokuhara S, Saida T, Oguchi M, Matsumoto K, Murase S, Oguchi S. Number of acquired melanocytic nevi in patients with melanoma and control subjects in Japan: Nevus count is a significant risk factor for nonacral melanoma but not for acral melanoma. *J Am Acad Dermatol* 2004;50(5):695-700.
7. Abarca JF, Casiccia CC. Skin cancer and ultraviolet-B radiation under the Antarctic ozone hole: southern Chile, 1987-2000. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2002;18(6):294-302.
8. Carli P, Biggeri A, Giannotti B. Malignant melanoma in Italy: risks associated with common and clinically atypical melanocytic nevi. *J Am Acad Dermatol* 1995;32(5 Pt 1):734-9.



9. Hall HI, Miller DR, Rogers JD, Bewerse B. Update on the incidence and mortality from melanoma in the United States. *J Am Acad Dermatol* 1999;40(1):35-42.
10. Martin RC, Robinson E. Cutaneous melanoma in Caucasian New Zealanders: 1995-1999. *ANZ J Surg* 2004;74(4):233-7.
11. Tyler I, Rivers JK, Shoveller JA, Blum A. Melanoma detection in British Columbia, Canada. *J Am Acad Dermatol* 2005;52(1):48-54.
12. Levi F, Te VC, Randimbison L, La Vecchia C. Trends in incidence of various morphologies of malignant melanoma in Vaud and Neuchatel, Switzerland. *Melanoma Res* 2005;15(1):73-5.
13. Tabenkin H, Tamir A, Sperber AD, Shapira M, Shvartzman P. A case-control study of malignant melanoma in Israeli kibbutzim. *Isr Med Assoc J* 1999;1(3):154-7.
14. Balzi D, Carli P, Giannotti B, Paci E, Buiatti E. Cutaneous melanoma in the Florentine area, Italy: incidence, survival and mortality between 1985 and 1994. *Eur J Cancer Prev* 2003;12(1):43-8.
15. Diffey BL. The future incidence of cutaneous melanoma within the UK. *Br J Dermatol* 2004;151(4):868-72.
16. Marks R. Epidemiology of melanoma. *Clin Exp Dermatol* 2000;25(6):459-63.
17. Darlington S, Siskind V, Green L, Green A. Longitudinal study of melanocytic nevi in adolescents. *J Am Acad Dermatol* 2002;46(5):715-22.
18. Kanzler MH, Mraz-Gernhard S. Primary cutaneous malignant melanoma and its precursor lesions: diagnostic and therapeutic overview. *J Am Acad Dermatol* 2001;45(2):260-76.
19. Holly EA, Kelly JW, Shpall SN, Chiu SH. Number of melanocytic nevi as a major risk factor for malignant melanoma. *J Am Acad Dermatol* 1987;17(3):459-68.
20. Bataille V, Grulich A, Sasieni P, Swerdlow A, Newton Bishop J, McCarthy W, *et al.* The association between naevi and melanoma in populations with different levels of sun

- exposure: a joint case-control study of melanoma in the UK and Australia. *Br J Cancer* 1998;77(3):505-10.
21. Kaddu S, Smolle J, Zenahlik P, Hofmann-Wellenhof R, Kerl H. Melanoma with benign melanocytic naevus components: reappraisal of clinicopathological features and prognosis. *Melanoma Res* 2002;12(3):271-8.
22. Tannous ZS, Mihm MC Jr, Sober AJ, Duncan LM. Congenital melanocytic nevi: clinical and histopathologic features, risk of melanoma, and clinical management. *J Am Acad Dermatol* 2005;52(2):197-203.
23. Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS, Pasquini P, Picconi O, Boyle P, *et al.* Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: II. Sun exposure. *Eur J Cancer* 2005;41(1):45-60.
24. Tronnier M, Smolle J, Wolff HH. Ultraviolet irradiation induces acute changes in melanocytic nevi. *J Invest Dermatol* 1995;104(4):475-8.
25. Tronnier M, Wolff HH. UV-irradiated melanocytic nevi simulating melanoma in situ. *Am J Dermatopathol* 1995;17(1):1-6.
26. Tronnier M, Rudolph P, Koser T, Raasch B, Brinckmann J. One single erythemagenic UV irradiation is more effective in increasing the proliferative activity of melanocytes in melanocytic naevi compared with fractionally applied high doses. *Br J Dermatol* 1997;137(4):534-9.
27. Nagase H, Woessner JF Jr. Matrix Metalloproteinases. *J Biol Chem* 1999, 274:21491-4.
28. Gillard JA, Reed MW, Buttle D, Cross SS, Brown NJ. Matrix metalloproteinase activity and immunohistochemical profile of matrix metalloproteinase-2 and -9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 during human dermal wound healing. *Wound Repair Regen* 2004;12(3):295-304.
29. de Almeida H Jr, Zigrino P, Muller F, Krieg T, Korge B, Mauch C. Human scalp dermal papilla and fibrous sheath cells have a different expression profile of matrix

metalloproteinases in vitro when compared to scalp dermal fibroblasts. *Arch Dermatol Res* 2005;1-6. (epub ahead of print)

30. Fisher GJ, Wang Z, Datta SC, Varani J, Kang S, Voorhees JJ. Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light. *N Engl J Med* 1997; 337(20):1419-28.

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

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

33. Hofmann UB, Westphal JR, Waas ET, Zendman AJ, Cornelissen IM, Ruiter DJ, et al. 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.

34. Hofmann UB, Westphal JR, Van Muijen GN, Ruiter DJ. Matrix metalloproteinases in human melanoma. *J Invest Dermatol* 2000;115(3):337-44.

35. Kobayashi T, Hattori S, Shinkai H. Matrix metalloproteinases-2 and -9 are secreted from human fibroblasts. *Acta Derm Venereol* 2003;83(2):105-7.

36. Brenneisen P, Sies H, Scharfetter-Kochanek K. Ultraviolet-B irradiation and matrix metalloproteinases: from induction via signaling to initial events. *Ann N Y Acad Sci* 2002;973:31-43

37. Murphy G, Knauper V, Atkinson S, Butler G, English W, Hutton M, et al. Matrix metalloproteinases in arthritic disease. *Arthritis Res* 2002;4(3):S39-49.

38. Nagase H, Barrett AJ, Woessner JF Jr. Nomenclature and glossary of the matrix metalloproteinases. *Matrix Suppl* 1992;1:421-4.

39. Lauer-Fields JL, Sritharan T, Stack MS, Nagase H, Fields GB. Selective hydrolysis of triple-helical substrates by matrix metalloproteinase-2 and -9. *J Biol Chem* 2003;278(20):18140-5.
40. Bjorklund M, Koivunen E. Gelatinase-mediated migration and invasion of cancer cells. *Biochim Biophys Acta* 2005;1755(1):37-69.
41. Gaiotto MA, Focchi J, Ribalta JL, Stavale JN, Baracat EC, Lima GR, *et al.* Comparative study of MMP-2 (matrix metalloproteinase 2) immune expression in normal uterine cervix, intraepithelial neoplasias, and squamous cells cervical carcinoma. *Am J Obstet Gynecol* 2004;190(5):1278-82.
42. Ondo K, Sugio K, Yamazaki K, Yamaguchi M, Yano T, Yoshino I, *et al.* The significance of serum active matrix metalloproteinase-9 in patients with non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2004;46(2):205-13.
43. Yamamoto H, Vinitketkumnuen A, Adachi Y, Taniguchi H, Hirata T, Miyamoto N, *et al.* Association of matrilysin-2 (MMP-26) expression with tumor progression and activation of MMP-9 in esophageal squamous cell carcinoma. *Carcinogenesis* 2004;25(12):2353-60.
44. Lin SY, Wang YY, Sheu WH. Preoperative plasma concentrations of vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinase 9 are associated with stage progression in papillary thyroid cancer. *Clin Endocrinol* 2003;58(4):513-8.
45. Liu WW, Zeng ZY, Wu QL, Hou JH, Chen YY. Overexpression of MMP-2 in laryngeal squamous cell carcinoma: a potential indicator for poor prognosis. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2005;132(3):395-400.
46. Mook OR, Frederiks WM, Van Noorden CJ. The role of gelatinases in colorectal cancer progression and metastasis. *Biochim Biophys Acta* 2004;1705(2):69-89.
47. Hofmann UB, Eggert AA, Blass K, Brocker EB, 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(23):8221-5.

48. Ntayi C, Hornebeck W, Bernard P. Influence of cultured dermal fibroblasts on human melanoma cell proliferation, matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) expression and invasion in vitro. *Arch Dermatol Res* 2003;295(6):236-41.

49. Ohnishi Y, Tajima S, Ishibashi 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.

50. Kurschat P, Wickenhauser C, Groth W, Krieg T, Mauch C. Identification of activated matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) as the main gelatinolytic enzyme in malignant melanoma by in situ zymography. *J Pathol* 2002;197(2):179-87.

51. Vaisanen A, Tuominen H, Kallioinen M, Turpeenniemi-Hujanen T. Matrix metalloproteinase-2 (72 kD type IV collagenase) expression occurs in the early stage of human melanocytic tumour progression and may have prognostic value. *J Pathol* 1996;180(3):283-9.

52. 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.

53. Van Den Oord JJ, Paemen L, Opednakker G, De Wolf-Peeters C. Expression of gelatinase B and the extracellular matrix metalloproteinase inducer EMMPRIN in benign and malignant pigment cell lesions of the skin. *Am J Pathol* 1997;151(3):665-70.

54. Koivukangas V, Kallioinen M, Autio-Harmainen H, Oikarinen A. UV irradiation induces the expression of gelatinases in human skin in vivo. *Acta Derm Venereol* 1994;74(4):279-82.

55. Onoue S, Kobayashi T, Takemoto Y, Sasaki I, Shinkai H. Induction of matrix metalloproteinase-9 secretion from human keratinocytes in culture by ultraviolet B irradiation. *J Dermatol Sci* 2003;33(2):105-11.
56. Krengel S, Alexander M, Brinckmann J, Tronnier M. MMP-2, TIMP-2 and MT1-MMP are differentially expressed in lesional skin of melanocytic nevi and their expression is modulated by UVB-light. *J Cutan Pathol* 2002;29(7):390-6.
57. Mariante JC. Alterações Clínicas, dermatoscópicas, histopatológicas e imuno-histoquímicas de nevos melanocíticos irradiados com raios ultravioleta B[dissertação]. Porto Alegre(RS): UFRGS;2003
58. Hsu SM, Raine L, Fanger H. The use of antiavidin antibody and avidin-biotin-peroxidase complex in immunoperoxidase technics. *Am J Clin Pathol* 1981;75(6):816-21.
59. Bonamigo RR. A expressão imunoistoquímica das metaloproteinasas -2 e -9 da matriz na rosácea inflamatória[tese]. Porto Alegre(RS): UFRGS; 2003.
60. Redondo P, Lloret P, Idoate M, Inoges S. Expression and serum levels of MMP-2 and MMP-9 during human melanoma progression. *Clin Exp Dermatol* 2005; 30:541-5.
61. Hofmann UB, Westphal JR, Zendman AJ, Becker JC, Ruiter DJ, van Muijen GN. Expression and activation of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and its co-localization with membrane-type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) correlate with melanoma progression. *J Pathol* 2000;191(3):245-56.
62. Schnaeker EM, Ossig R, Ludwig T, Dreier R, Oberleithner H, Wilhelmi M, *et al.* Microtubule-dependent matrix metalloproteinase-2/matrix metalloproteinase-9 exocytosis: prerequisite in human melanoma cell invasion. *Cancer Res* 2004;64(24):8924-31.
63. Fisher GJ, Datta SC, Talwar HS, Wang ZQ, Varani J, Kang S, *et al.* Molecular basis of sun-induced premature skin ageing and retinoid antagonism. *Nature* 1996;379(6563):335-9.

64. Kozak I, Klisenbauer D, Juhas T. UV-B induced production of MMP-2 and MMP-9 in human corneal cells. *Physiol Res* 2003;52(2):229-34.
65. Kupper TS, Chua AO, Flood P, Mcguire J, Gubler U. Interleukin 1 gene expression in cultured human keratinocytes is augmented by ultraviolet irradiation. *J Clin Invest* 1987;80(2):430-6.
66. Kobayashi T, Hattori S, Nagai Y, Sakuraoka K, Nishikawa T. Secretion of different types of gelatinases from cultured human keratinocytes. *J Dermatol* 1997;24(4):213-6.
67. Bizik J, Bessou S, Felnerova D, Vaheiri A, Taieb A. The proteolytic potential of normal human melanocytes: comparison with other skin cells and melanoma cell lines. *Pigment Cell Res* 1996;9(5):255-64.
68. Lei TC, Vieira WD, Hearing VJ. In vitro migration of melanoblasts requires matrix metalloproteinase-2: implications to vitiligo therapy by photochemotherapy. *Pigment Cell Res* 2002;15(6):426-32.
69. Wu CS, Yu CL, Wu CS, Lan CC, Yu HS. Narrow-band ultraviolet-B stimulates proliferation and migration of cultured melanocytes. *Exp Dermatol* 2004;13(12):755-63.
70. Gontier E, Cario-Andre M, Vergnes P, Bizik J, Surleve-Bazeille JE, Taieb A. The 'Abtropfung phenomenon' revisited: Dermal nevus cells from congenital nevi cannot activate matrix metalloproteinase 2 (MMP-2). *Pigment Cell Res* 2003;16(4):366-73.
71. Vacca A, Moretti S, Ribatti D, Pellegrino A, Pimpinelli N, Bianchi B, *et al.* Progression of mycosis fungoides is associated with changes in angiogenesis and expression of the matrix metalloproteinases 2 and 9. *Eur J Cancer* 1997;33(10):1685-92.
72. Mirastschijski U, Impola U, Jahkola T, Karlsmark T, AGren MS, Saarialho-Kere U. Ectopic localization of matrix metalloproteinase-9 in chronic cutaneous wounds. *Hum Pathol* 2002;33(3):355-64.

73. Jackson CJ, Nguyen M. Human microvascular endothelial cells differ from macrovascular endothelial cells in their expression of matrix metalloproteinases. *Int J Biochem Cell Biol* 1997;29(10):1167-77.
74. Lamoreaux WJ, Fitzgerald ME, Reiner A, Hasty KA, Charles ST. Vascular endothelial growth factor increases release of gelatinase A and decreases release of tissue inhibitor of metalloproteinases by microvascular endothelial cells in vitro. *Microvasc Res* 1998;55(1):29-42.
75. Hirota A, Ebihara T, Kusubata M, Kobayashi M, Kobayashi K, Kuwaba K, *et al.* Collagen of chronically inflamed skin is over-modified and upregulates secretion of matrix metalloproteinase 2 and matrix-degrading enzymes by endothelial cells and fibroblasts. *J Invest Dermatol* 2003;121(6):1317-25.
76. Kut C, Hornebeck W, Groult N, Redziniack G, Godeau G, Pellat B. Influence of successive and combined ultraviolet A and B irradiations on matrix metalloelastases produced by human dermal fibroblasts in culture. *Cell Biol Int* 1997;21(6):347-52.
77. Ohnishi Y, Tajima S, Akiyama M, Ishibashi A, Kobayashi R, Horii I. Expression of elastin-related proteins and matrix metalloproteinases in actinic elastosis of sun-damaged skin. *Arch Dermatol Res* 2000;292(1):27-31.
78. Kossodo S, Wong WR, Simon G, Kochevar IE. Effects of UVR and UVR-induced cytokines on production of extracellular matrix proteins and proteases by dermal fibroblasts cultured in collagen gels%. *Photochem Photobiol* 2004;79(1):86-93.
79. Kobayashi T, Onoda N, Takagi T, Hori H, Hattori S, Nagai Y, *et al.* Immunolocalizations of human gelatinase (type IV collagenase, MMP-9) and TIMP (tissue inhibitor of metalloproteinases) in normal epidermis and some epidermal tumors. *Arch Dermatol Res* 1996;288(5-6):239-44.
80. Kobayashi T, Shinkai H. Leptomycin B reduces matrix metalloproteinase-9 expression and suppresses cutaneous inflammation. *J Invest Dermatol* 2005;124(2):331-7.



81. Chan VT, Zhang DN, Nagarayapu U, Hultquist K, Romero LI, Herron GS. Membrane-type matrix metalloproteinases in human dermal microvascular endothelial cells: expression and morphogenetic correlation. *J Invest Dermatol* 1998;111(6):1153-9.
82. Nguyen M, Arkell J, Jackson CJ. Active and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-free gelatinase B accumulates within human microvascular endothelial vesicles. *J Biol Chem* 1998;273(9):5400-4.
83. Han YP, Tuan TL, Hughes M, Wu H, Garner WL. Transforming growth factor-beta - and tumor necrosis factor-alpha -mediated induction and proteolytic activation of MMP-9 in human skin. *J Biol Chem* 2001;276(25):22341-50.
84. Kratz G, Jansson K, Gidlund M, Haegerstrand A. Keratinocyte conditioned medium stimulates type IV collagenase synthesis in cultured human keratinocytes and fibroblasts. *Br J Dermatol* 1995;133(6):842-6.

TABLE 1: Semi-quantitative analysis of MMP-2 in irradiated and non-irradiated sides.

MMP-2	Irradiated side				Non-irradiated side				p
	Mean (ISS)	Standard deviation	Median	ICC	Mean (NISS)	Standard deviation	Median	ICC	
KERA	1.56	0.72	1.67	0.71	1.25	0.76	1.33	0.62	< 0.0001
EMEL	1.7	0.67	1.67	0.54	1.04	0.61	1.00	0.45	< 0.0001
DMEL	1.32	0.56	1.33	0.35	0.94	0.68	1.00	0.53	< 0.0001
ENDO	1.03	0.62	1.00	0.47	0.77	0.60	0.67	0.46	< 0.0001
FIBR	1.11	0.62	1.00	0.47	0.90	0.56	0.83	0.55	< 0.0001

*MMP-2: matrix metalloproteinase-2; ISS: irradiated side score; NISS: non-irradiated side score; ICC: intraclass correlation coefficient; KERA: keratinocytes; EMEL: epidermal melanocytes; DMEL: dermal melanocytes; ENDO: endothelial cells; FIBR: fibroblasts.*

TABLE 2: Semi-qualitative analysis of MMP-9 in irradiated and non-irradiated sides.

MMP-9	Irradiated side				Non-irradiated side				p
	Mean (ISS)	Standard deviation	Median	ICC	Mean (NISS)	Standard deviation	Median	ICC	
KERA	2.39	0.80	2.67	0.75	2.18	0.90	2.67	0.79	0.072
EMEL	1.83	0.76	2.00	0.71	1.40	0.86	1.17	0.73	< 0.0001
DMEL	1.67	0.78	1.67	0.58	1.44	0.84	1.50	0.51	< 0.0001
ENDO	1.83	0.91	2.00	0.62	1.59	0.94	1.67	0.64	0.004
FIBR	1.79	0.79	1.67	0.50	1.56	0.76	1.67	0.52	0.012

*MMP-9: matrix metalloproteinase-9; ISS: irradiated side score; NISS: non-irradiated side score; ICC: intraclass correlation coefficient; KERA: keratinocytes; EMEL: epidermal melanocytes; DMEL: dermal melanocytes; ENDO: endothelial cells; FIBR: fibroblasts.*

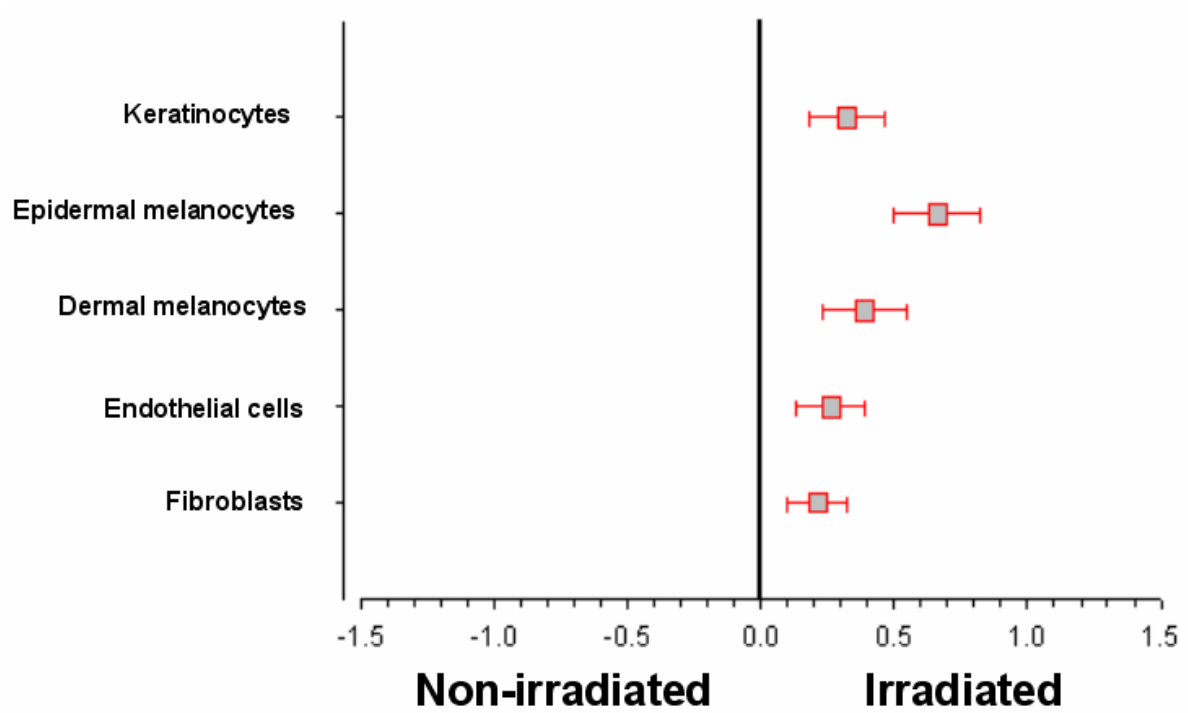


FIGURE 1: Differences between mean scores (ISS – NISS) of immunohistochemical expression of MMP-2 considering irradiated and non-irradiated sides.

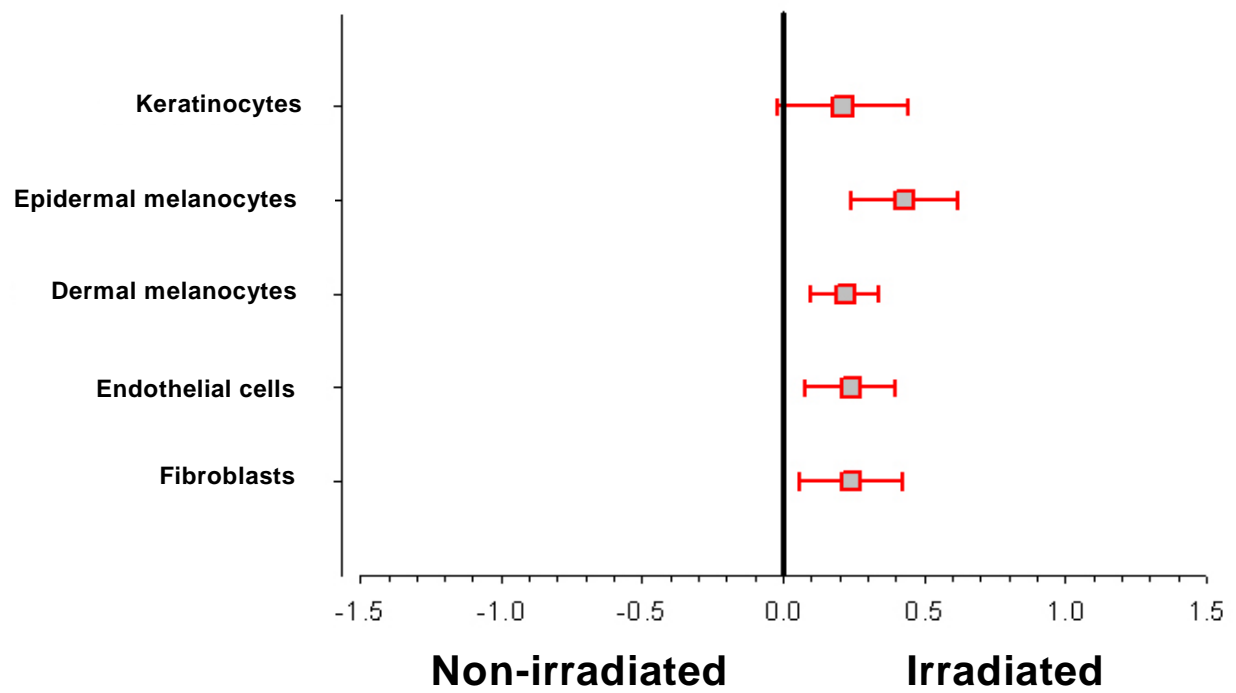


FIGURE 2: Differences between mean scores (ISS – NISS) of immunohistochemical expression of MMP-9 considering irradiated and non-irradiated sides.

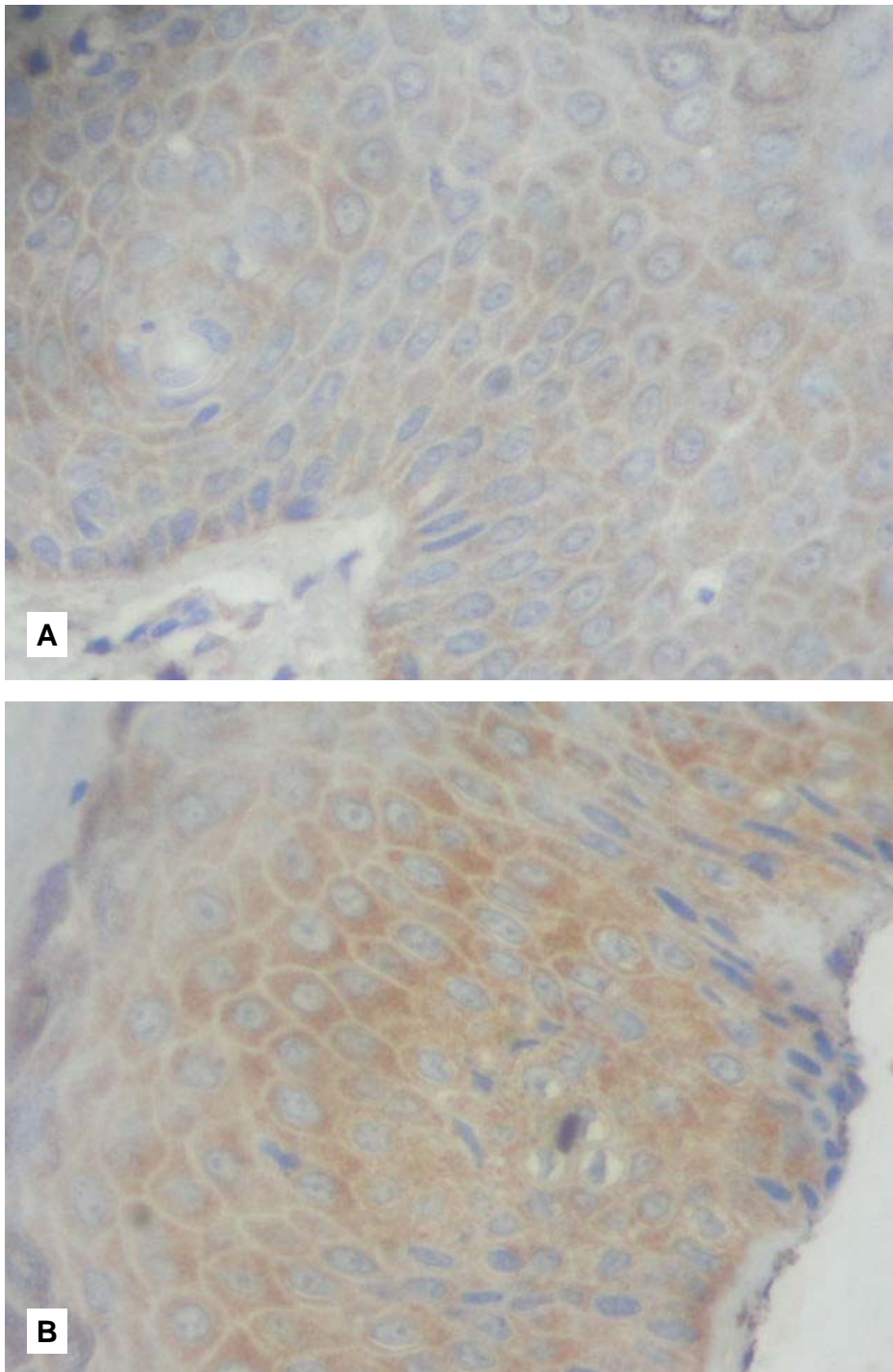


FIGURE 3: *A.* Immunohistochemical expression (1+) of MMP-2 of keratinocytes on non-irradiated side; *B.* Immunohistochemical expression (2+) of MMP-2 of keratinocytes on irradiated side. (original magnification, immunoperoxidase – DAB, x 400)

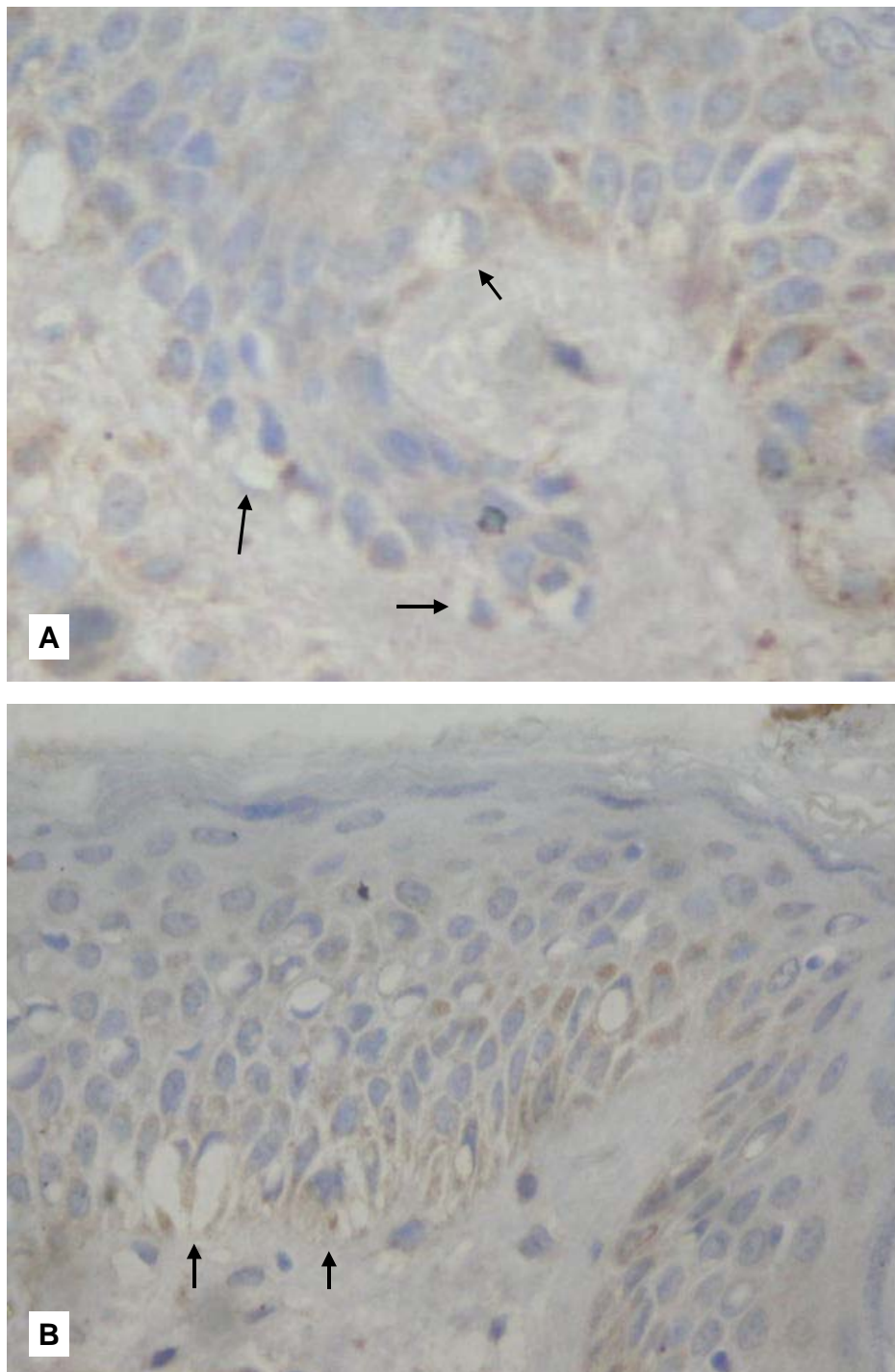


FIGURE 4: A. Immunohistochemical expression (1+) of MMP-2 of epidermal melanocytes (→) on non-irradiated side; B. Immunohistochemical expression (2+) of MMP-2 of epidermal melanocytes (→) on irradiated side. (original magnification, immunoperoxidase – DAB, x 400)

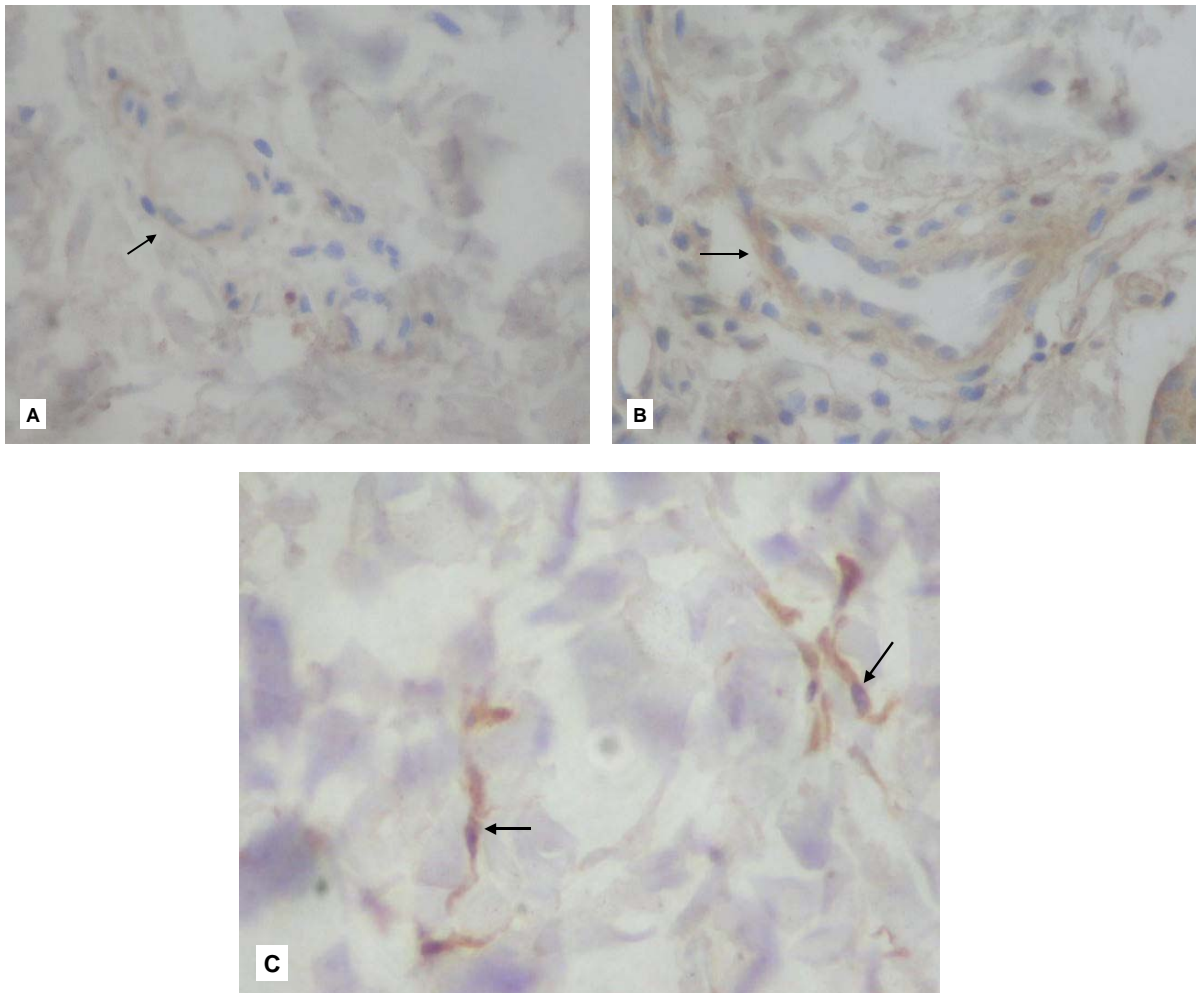


FIGURE 5: A. Immunohistochemical expression (1 +) of MMP-9 of endothelial cells on non-irradiated side (→); B. Immunohistochemical expression (2+) of MMP-9 of endothelial cells on irradiated side (→); C. Immunohistochemical expression (3+) of MMP-9 of fibroblasts on irradiated side (→). (original magnification, immunoperoxidase – DAB, x 400)



## 11. ARTIGO EM PORTUGUÊS

**Os efeitos agudos da radiação ultravioleta B na expressão imunoistoquímica das metaloproteinases –2 e –9 em nevos melanocíticos**

### **Autores**

Renato Marchiori Bakos, Lucio Bakos, Maria Isabel Albano Edelweiss, André Cartell, José Carlos Mariante, Nathália Costaguta Matas Solés

Serviços de Dermatologia e Patologia – Hospital de Clínicas de Porto Alegre,  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil

### **Correspondência**

Renato Marchiori Bakos – Rua Coronel Bordini, 889, CEP 90040-001, Porto Alegre, RS,  
Brazil. Fone/Fax: 51 33319322; e-mail: [renato@clinicabakos.com.br](mailto:renato@clinicabakos.com.br)

## RESUMO

**Introdução:** a incidência dos melanomas permanece em ascensão em diversos países. Os nevos melanocíticos podem ser seus precursores ou marcadores de risco. A radiação ultravioleta é o principal fator de risco ambiental para o seu desenvolvimento. Estudos com nevos irradiados mostram que a radiação ultravioleta B (UVB) pode causar alterações morfológicas e bioquímicas semelhantes às de um melanoma *in situ*. As metaloproteinases da matriz (MMP) são enzimas proteolíticas e, particularmente, as MMP-2 e -9 (gelatinases A e B) parecem estar associadas à invasão tumoral, à formação de metástases e de neoangiogênese em melanomas. O objetivo do presente estudo é avaliar os efeitos da UVB nas expressões imunoistoquímicas de MMP-2 e -9 nas diferentes linhagens celulares de nevos melanocíticos.

**Métodos:** quarenta e dois nevos melanocíticos tiveram suas metades irradiadas com dose de 2 DEM (dose eritematosa mínima) de UVB e foram excisados uma semana após. As expressões imunoistoquímicas das MMP-2 e -9 foram comparadas, quanto à sua intensidade, por três avaliadores diferentes entre os lados irradiados e não irradiados em queratinócitos, melanócitos de epiderme e derme superior, células endoteliais e fibroblastos. Os dados foram analisados pelo teste t pareado para as diferenças de expressão e pelo ICC para avaliação da homogeneidade entre as respostas dos observadores.

**Resultados:** com relação à expressão imunoistoquímica de MMP-2, todas as linhagens celulares mostraram aumento no lado irradiado, especialmente os melanócitos epidérmicos. Quanto à MMP-9, somente nos queratinócitos, não se observou aumento de expressão do lado irradiado, ficando essa evidente nas demais linhagens celulares avaliadas.

**Conclusões:** A UVB na dose de 2 DEM aumenta a expressão imunistoquímica das MMP-2 e -9 em quase todas as linhagens celulares dos nevos melanocíticos avaliados até uma semana após a irradiação, com exceção feita queratinócitos, com a MMP-9.

**Descritores/unitermos:** raios ultravioleta, nevos e melanomas, gelatinase A, gelatinase B, fotobiologia.

## INTRODUÇÃO

A incidência do melanoma vem aumentando nas últimas décadas na população branca de todo o mundo (1-15), tornando-se, inclusive, um problema de saúde pública em alguns países (1). O diagnóstico precoce permanece ainda a medida mais importante no manejo do melanoma. Entretanto, métodos terapêuticos podem ser aprimorados ou mesmo criados, à medida que novos estudos aumentam os conhecimentos referentes aos mecanismos, ligados ao seu surgimento, à invasão tumoral e à formação de metástases,

É bem sabido que características individuais, tais como fototipos claros, presença quantitativa de nevos melanocíticos adquiridos, presença de nevos atípicos e história familiar de melanoma, são os principais fatores constitucionais responsáveis pelo seu surgimento (1, 4, 16, 17).

Os nevos melanocíticos são lesões benignas, derivadas dos melanócitos, podendo ser congênitos quando presentes no nascimento ou no primeiro ano de vida, ou adquiridos quando surgem a partir dessa idade (18). Sua presença em grande número (> 50 nevos) é um importante marcador de risco para o surgimento do melanoma (18-20). Além disso, alguns nevos melanocíticos são considerados, também, seus precursores (2, 21, 22).

A radiação ultravioleta (RUV) é considerada o principal fator de risco ambiental para o surgimento do melanoma, principalmente através de um padrão intermitente de exposição solar e de história de queimaduras solares (23). Estudos experimentais demonstram que os nevos melanocíticos podem sofrer alterações morfológicas e bioquímicas, porém transitórias, quando irradiados com duas a quatro doses eritematosas mínimas (DEM) de radiação ultravioleta B (UVB), podendo assemelhar-se a nevos atípicos ou até simular melanomas *in situ* (24-26).

As metaloproteinases da matriz (MMPs) formam um grupo de enzimas proteolíticas que participam do processo de remodelamento e degradação da matriz extracelular e de membranas basais, em processos fisiológicos e patológicos (27-34). Mais de vinte tipos de MMP já foram identificados, sendo divididas de acordo com seus substratos e funções, em subgrupos: as colagenases (MMP-1, -8, -12, -13, -18, -19, -20), as gelatinases (MMP-2 e -9), as matrilisinas (MMP-7 e -26), as estromelisinases (MMP-3, -10, -11) e as metaloproteinases de membrana (MMP-14, -15, -16, -17, -24 e -25) (35-37).

As MMP- 2 e -9 têm, no colágeno desnaturado (gelatina), um importante substrato e, por isso, também são chamadas de gelatinases A e B (38). Degradam o colágeno tipo -IV, principal componente das membranas basais, e, dessa forma, têm, computadas dentre as suas funções, as de participação do processo de migração de células tumorais, invasão tumoral de tecidos adjacentes e, conseqüentemente, formação de metástases ( 37, 39-46).

Diversos estudos demonstram que melanomas apresentam expressão aumentada de gelatinases, enquanto que, em nevos melanocíticos, elas se encontram negativas ou fracamente positivas (47-53).

A radiação ultravioleta pode atuar como indutor dos genes das gelatinases (36). Experimentos com queratinócitos e fibroblastos cultivados *in vitro* comprovam que a RUV aumenta a expressão de gelatinases nessas células (54, 55).

Pouco se sabe sobre o efeito da RUV na expressão de gelatinases em células de nevos melanocíticos *in vivo*. A expressão da MMP-2 parece aumentar em queratinócitos, porém não em melanócitos; não obstante, faltam experimentos na literatura que estudem o comportamento *in vivo* da MMP-9 em nevos melanocíticos irradiados (56).

O objetivo principal do presente estudo foi avaliar os efeitos de uma dose de 2 DEM de radiação UVB na expressão das gelatinases *in vivo* nos melanócitos de nevos melanocíticos. Os objetivos secundários eram avaliar a expressão das gelatinases com a

irradiação em outras linhagens celulares, epiteliais e de derma superior, que compõem os nevos melanocíticos, tais como os queratinócitos, os fibroblastos e as células endoteliais.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Um estudo experimental com nevos melanocíticos irradiados com UVB foi delineado nos Serviços de Dermatologia e Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul). Todo o material biológico utilizado adveio do arquivo de blocos de parafina do Serviço de Patologia, havendo sido produzido a partir de estudo anterior, cujos procedimentos são descritos a seguir (57).

### **Pacientes e Irradiação**

O material utilizado provinha de pacientes de ambos os sexos, com idade superior a 18 anos ou inferior, mas acompanhada de autorização dos pais, que fossem portadores de nevos melanocíticos e desejassem ter os nevos excisados. Foram incluídos pacientes com nevos sem evidências clínicas de malignidade, com diâmetro entre 5mm e 10mm e excluídos aqueles portadores de lesões sangrantes ou com infecção secundária, localizadas na face, bem como gestantes, portadores de doenças fotossensíveis, pacientes em uso de drogas potencialmente fotossensibilizantes ou com história de exposição solar nos últimos 30 dias.

O estudo passou a ser conduzido, após a sua aprovação pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Os pacientes deram seu consentimento informado e eram submetidos a exame dermatológico, para seleção dos nevos a serem excisados. A medição da Dose Eritematosa Mínima (DEM) foi realizada na região infra-axilar torácica em técnica padronizada (24). O equipamento empregado foi o Psora-comb Dermalight 80 (Dr. K.

Hönle GmbH, Munique, Alemanha), com tempos de exposição variando de 30 a 180 segundos, o que correspondia a doses de UVB entre 15 mJ/cm<sup>2</sup> e 91,8 mJ/cm<sup>2</sup> com moda de 45,9 mJ/cm<sup>2</sup>. O aparelho contém duas lâmpadas fluorescentes que emitem um espectro contínuo com pico de emissão em 313 nm e intensidade de irradiação de 5,1x10 W/cm<sup>2</sup> de UVB e 6,15x10 W/cm<sup>2</sup> de UVA, após 5 minutos de aquecimento. Possui um afastador rígido que o mantém a uma distância fixa da pele.

Após 24 horas, realizava-se a leitura da DEM. A seguir, uma metade da lesão melanocítica era coberta transversalmente com uma fita isolante foto-opaca, não fotossensível; a outra, submetida a uma irradiação referente a 2 DEM com o mesmo aparelho utilizado para sua aferição (24,26,57). Uma semana após a irradiação, os nevos eram excisados (24,26,57).

### **Imunoistoquímica**

Os espécimes foram fixados em formalina tamponada a 10%, havendo sido submetidos aos procedimentos de rotina, inclusão em parafina e secção em cortes de 5 micrômetros em direção longitudinal, com o propósito de se poderem observar, nesses mesmos cortes histológicos, simultaneamente os lados irradiados e não irradiados, tanto nas lâminas coradas por hematoxilina e eosina (H-E), como naquelas em que foram empregadas técnicas de imunoistoquímica.

A imunoistoquímica foi realizada conforme as etapas descritas a seguir, baseado na técnica de Hsu *et al* (58): (1) Reidratação das lâminas (xilol – álcool – água destilada); (2) recuperação antigênica com tampão citrato e bloqueio da peroxidase endógena; (3) aplicação dos anticorpos primários para MMP-2 (Neomarkers Incorporation, Fremont, EUA) e MMP-9 (Neomarkers Incorporation, Fremont, EUA) e do anticorpo secundário associado ao sistema de amplificação biotina-estreptavidina (Novocastra Laboratories Ltd. – Newcastle, Inglaterra); (4) aplicação de solução cromógena de diaminobenzidina (DAKO Corporation, Carpinteria, USA) e de contra-coloração com hematoxilina de Harris.

A partir da recuperação antigênica, em todas as etapas ocorreu a lavagem prévia com tampão PBS (cloreto de sódio, com fosfato de sódio monobásico e fosfato de sódio dibásico) ( Reagen, Rio de Janeiro, Brasil).

### **Variáveis**

As lâminas histológicas, tanto coradas por H-E, como por técnica de imunistoquímica, foram examinadas por três observadores independentes. Para avaliar a expressão das metaloproteinases -2 e -9, foi utilizado método semi-quantitativo, em que: 0 significava ausência de expressão; 1+ expressão fraca; 2+ expressão moderada e 3+ expressão forte. Caso houvesse diferentes graus de intensidade em um mesmo lado, privilegiava-se o local de maior expressão. A expressão das gelatinases foi avaliada nos queratinócitos, nos melanócitos epidérmicos e dérmicos de ninhos superficiais, nas células endoteliais e nos fibroblastos de derma superior, tanto nos lados irradiados (LI), como nos não-irradiados (LNI). A média das avaliações foi utilizada como escore final (ELI e ELNI) (59).

As alterações morfológicas dos melanócitos e queratinócitos, secundárias à irradiação, também receberam um grau entre 0, quando negativas, e 3 +, de acordo com a presença de atipias, hiperplasia, aumento de núcleo ou citoplasma nos melanócitos e paraceratose ou hiperplasia na epiderme, avaliadas através de cortes histológicos convencionais, corados pelo método de H-E. O escore final constituía-se da média de graus das análises dos avaliadores, assim como foi feito com a análise da imunistoquímica, para cada um dos lados.

### **Análise estatística**

Os dados foram analisados através do programa SPSS, versão 11. O teste utilizado para tratamento estatístico foi o teste T pareado. Os dados eram considerados estatisticamente significativos quando apresentavam um  $p < 0,05$ . Para medir a homogeneidade das aferições entre os três observadores, foi efetuado o ICC (*intraclass*



*correlation coefficient*), sendo considerado bom um ICC superior a 0,7, e regular aquele acima de 0,4.

## RESULTADOS

Foram analisados quarenta e dois nevos melanocíticos irradiados. Desses, 6 eram junctionais; 9, intradérmicos; e 27, compostos.

Os cortes corados por H-E demonstraram que os lados irradiados dos nevos apresentam mais alterações morfológicas de melanócitos do que os lados não-irradiados. (ELI: 2,08 e ELNI: 1,10;  $p < 0,001$ ), assim como nos queratinócitos (ELI: 1,50 e ELNI: 0,79;  $p < 0,001$ ).

Na avaliação da expressão imunoistoquímica de MMP -2, os lados irradiados apresentaram aumento de expressão em todas as linhagens celulares, comparando com os lados não-irradiados. Os melanócitos localizados na epiderme obtiveram uma maior diferença de escore (ELI-1,70, ELNI-1,04;  $p < 0,001$ ), seguidos dos melanócitos dérmicos (ELI-1,32, ELNI-0,94;  $p < 0,001$ ), dos queratinócitos (ELI-1,56, ELNI-1,25;  $p < 0,001$ ), das células endoteliais (ELI-1,03, ELNI-0,77;  $p < 0,001$ ) e dos fibroblastos (ELI-1,11, ELNI-0,90;  $p < 0,001$ ). (figura 1)

Quanto à expressão de MMP-9, não se constatou diferença estatisticamente significativa entre os dois lados nos queratinócitos (ELI-2,39, ELNI-2,18;  $p = 0,072$ ). As demais linhagens celulares, tais como os melanócitos epidérmicos (ELI-1,83, ELNI-1,40,  $p < 0,001$ ), os melanócitos dérmicos (ELI-1,67 ELNI-1,44;  $p < 0,001$ ), as células endoteliais (ELI-1,83, ELNI-1,59;  $p < 0,004$ ) e os fibroblastos (ELI-1,79, ELNI-1,56;  $p < 0,012$ ) apresentaram diferenças de escore estatisticamente significativas nos lados irradiados. (figura 2)

O ICC mostrou índices de regularidade bons na maioria das variáveis do estudo, variando de 0,35 a 0,82.

As tabelas 1 e 2 apresentam, respectivamente, os dados aferidos quanto à expressão imunohistoquímica das MMP-2 e -9 nos lados irradiados e não irradiados, nelas representados pelos, escore médio, desvio padrão, mediana, ICC, bem como pela análise de significância estatística de cada uma das variáveis estudadas.

As figuras 3 e 4 exemplificam, respectivamente, a maior expressão de MMP-2 em queratinócitos e melanócitos epidérmicos dos lados irradiados em relação aos não irradiados. A figura 5 evidencia a expressão mais acentuada de MMP-9 em células endoteliais e fibroblastos, nos lados irradiados.

## DISCUSSÃO

As MMP-2 e -9 são enzimas proteolíticas zinco-dependentes que degradam o colágeno IV e, por isso, estão associadas à invasão tumoral, à formação de metástases e à neoangiogênese em pacientes com melanoma (34, 52, 60, 61). A expressão da MMP-2 parece aumentar com a progressão tumoral, sendo sugerida, inclusive, como um possível fator prognóstico nesses pacientes (51). A MMP-9, em um estudo *in vivo*, teve sua expressão relacionada à fase de crescimento radiado do melanoma, sendo negativa na fase de crescimento vertical, sugerindo que sua maior expressão estaria associada à fase de invasão precoce dos tumores (53). As metaloproteinases podem ser produzidas pelas células tumorais, mas, também pelas células do estroma (34, 47, 48). Sua produção e ativação são controladas de forma equilibrada pelos seus inibidores naturais, os inibidores teciduais das metaloproteinases (TIMPs) (62). Em situações patológicas como é o caso dos melanomas, esse equilíbrio costuma se perder, acelerando a atividade proteolítica e colaborando com o processo de evolução da doença (34).

Lesões melanocíticas benignas habitualmente apresentam expressões negativas ou fracamente positivas de gelatinases. Numa série de 25 lesões, Simonetti et al observaram expressões imunistoquímicas de fracas a moderadas de MMP-2 em nevos melanocíticos compostos, principalmente, em ninhos de derma papilar. Em nevos juncionais, a intensidade era mais proeminente em células localizadas na junção dermo-epidérmica. Nevos displásicos ou nevos compostos com atipias tinham expressões levemente superiores aos demais nevos (52). Em outro estudo, Vaisanen et al observaram que células névicas juncionais e dérmicas superiores expressavam MMP-2, sendo que no caso de uma maior desorganização arquitetural ou presença de atipias, a expressão aumentava (51). As expressões de MMP-9 foram negativas em todos esses nevos. Outros dois estudos que avaliaram a expressão imunistoquímica da MMP-9 em nevos melanocíticos, não observaram expressão positiva (52, 53).

A radiação ultravioleta B pode ser um dos indutores da expressão de gelatinases nos tecidos (30, 36, 54, 55, 63, 64). O mecanismo exato pelo qual isso ocorre não é totalmente conhecido, porém sabe-se que essa radiação estimula fatores transcripcionais como AP-1 e NF-kappa B e de interleucinas que participam da produção e secreção das MMP -2 e -9 (30, 63, 65). Trabalhos *in vitro* e *in vivo*, comprovam o aumento de expressão das MMP-2 e -9 na pele fotolesada (30, 54, 55). Entretanto, pouco se sabe dos efeitos que ela exerce na expressão das gelatinases em nevos melanocíticos, potenciais precursores de melanoma.

O presente estudo descreve as alterações causadas pela radiação ultravioleta B na dose de 2 DEM na expressão imunistoquímica das metaloproteinases -2 e -9 em nevos melanocíticos, uma semana após a irradiação. Os lados irradiados apresentaram, sistematicamente, mais alterações morfológicas nos queratinócitos e nos melanócitos, de forma, portanto, semelhante aos achados registrados nos trabalhos de Tronnier et al (24-26).

Com relação à expressão imunohistoquímica de MMP-2, os dados revelaram que, nos lados irradiados, melanócitos basais e dérmicos, queratinócitos, células endoteliais e fibroblastos apresentam um maior escore médio de expressão do que nos lados não-irradiados.

Esse aumento na expressão da MMP-2 dos queratinócitos de nevos melanocíticos já havia sido demonstrado por Krengel *et al.* Os autores avaliaram a expressão da MMP-2, TIMP-2 e MT1-MMP em 10 nevos melanocíticos irradiados com doses de 4 DEM de UVB. Registraram uma expressão de fraca à moderada de MMP-2 nos queratinócitos de 8 nevos, antes da irradiação, e, de moderada à forte, após a intervenção (56). Outros estudos, *in vitro*, também mostram que os queratinócitos expressam MMP-2 (35, 66) e que, *in vivo*, que a UVB pode aumentar sua expressão (30).

Krengel *et al.*, em seu trabalho com 10 nevos, não observaram expressões de MMP-2 em melanócitos, tanto antes, quanto após a irradiação das lesões (56). Nos melanócitos avaliados por este trabalho, houve aumento da expressão de MMP-2 no lado irradiado. Estudos *in vitro* já comprovaram que os melanócitos podem produzir de modo constitucional a MMP-2 (67, 68). Além disso, Wu *et al* evidenciaram que melanócitos em cultura expressavam MMP-2 e que tinham sua expressão aumentada após irradiação por UVB (69). Gontier e colaboradores constataram, por métodos de zimografia e *Western blotting*, que células névicas dérmicas produzem MMP-2, porém, somente na forma inativada (70). Essas pesquisas talvez possam fornecer substrato para os achados do presente estudo, que evidenciou a existência de um aumento da expressão de MMP-2 nos melanócitos irradiados, tanto epidérmicos, como dérmicos. Nesses últimos, a diferença de escores finais da avaliação pode ter sido inferior devido ao fato de a UVB atingir menos o derma do que a junção dermo-epidérmica.

A MMP-2 pode ser secretada também por células endoteliais (71-73). Em meio de cultura, o VEGF (vascular endothelial growth factor) e o colágeno extraído de pele com

reação inflamatória crônica já foram identificados, nessas células, como estimuladores de sua expressão (74, 75). Em estudo que utilizou o método de hibridização *in situ*, células endoteliais apresentavam sinais de RNAm MMP-2 (54). Não foi encontrada nenhuma pesquisa que descreva o aumento da expressão imunistoquímica da MMP-2 em células endoteliais do derma superior de nevos melanocíticos irradiados, fato que foi observado no presente estudo.

Em fibroblastos, a MMP-2 é secretada de modo constitucional (35). Neles, a radiação ultravioleta B já foi descrita como estimuladora à expressão de MMP-2 (35, 76). Ohnishi *et al*, utilizando o método de *Northern blot*, demonstraram que fibroblastos, situados no derma superior de peles fotolesadas, possuíam níveis mais elevados de RNAm MMP-2 que os dos controles (77). Recentemente, Kossodo *et al*, em um estudo *in vitro*, não encontraram aumento da expressão da MMP-2 em fibroblastos irradiados com UVB (78). Os dados do presente trabalho apontam uma diferença estatisticamente significativa entre as expressões imunistoquímicas da MMP-2 nos fibroblastos, ainda que tenha sido a menor encontrada dentro das linhagens celulares avaliadas.

Os melanócitos epidérmicos e do derma superior, as células endoteliais e os fibroblastos apresentaram escores médios de expressão imunistoquímica da MMP-9 maiores nos lados irradiados do que nos não irradiados. Nos queratinócitos, não houve diferença significativa entre os escores dos dois lados.

Na pele normal, ficou demonstrada a existência de expressão imunistoquímica de MMP-9 (79) e também que, *in vitro*, os queratinócitos possuem secreção constitucional da mesma (35). Outros estudos, em culturas de células, observaram que a radiação ultravioleta aumentava esse tipo de expressão nos queratinócitos (55, 69). A MMP-9 pode ativar citocinas, tais como o TGF- $\beta$ 1, TNF- $\alpha$  e IL-1, a partir de suas pró-formas e, assim, estimular sua própria secreção em queratinócitos através de um mecanismo autócrino (80). Neste estudo, não foi detectada diferença estatisticamente significativa entre as

expressões imunoistoquímicas da MMP-9 em queratinócitos de ambos os lados. É possível que um mecanismo autócrino, semelhante ao descrito acima, possa ter ocorrido após a irradiação. Assim, a MMP-9, expressa no lado irradiado, poderia ter exercido uma estimulação direta no lado não irradiado.

Dois experimentos prévios que avaliaram a expressão imunoistoquímica da MMP-9 em melanócitos de nevos melanocíticos não irradiados, não evidenciaram imunorreação nos cortes (52, 53). Mas isso não aconteceu no presente estudo, que é o primeiro a avaliar e demonstrar, *in vivo*, o aumento de expressão imunoistoquímica da MMP-9 em melanócitos de nevos melanocíticos irradiados com UVB. A possibilidade de melanócitos normais poderem ser secretores de MMP-9 já foi demonstrada, *in vitro*, por Bizik *et al*, com culturas de melanócitos (67).

Formas latentes de MMP-9 podem ser encontradas em culturas de células endoteliais da microvasculatura dérmica (81). Além disso, em estudo *in vitro*, ficou constatado que células endoteliais podem armazenar inclusive formas ativadas de MMP-9 para secreção imediata, o que poderia facilitar sua migração durante o processo angiogênico (82). Experimento *in vivo* com tecidos de cicatrizes evidenciou expressões imunoistoquímicas de MMP-9 nessas células (28). Os dados da presente amostra demonstram que a UVB pode aumentar a expressão imunoistoquímica de MMP-9, *in vivo*, nas células endoteliais do derma superior de nevos melanocíticos.

Por zimografia já foi demonstrado que fibroblastos podem secretar MMP-9, quando estimulados por citocinas (TGF- $\beta$ 1 e TNF- $\alpha$ ) (35, 83). Em meio de cultura, a expressão de MMP-9 em fibroblastos também aumentou quando esses foram irradiados com UVB (76). Em tecido de cicatrização, os fibroblastos têm expressão imunoistoquímica de MMP-9 (28). Os dados aferidos na presente amostra evidenciaram que, *in vivo*, quando estimulados pela radiação UVB, os fibroblastos do derma superior de nevos melanocíticos podem ter um aumento da expressão imunoistoquímica de MMP-9.

O aumento das expressões imunoistoquímicas nos lados irradiados dos nevos melanocíticos sugere que uma dose única de 2 DEM de UVB pode modificar a expressão imunoistoquímica das gelatinases *in vivo* até uma semana após a irradiação nesses tecidos, com exceção à MMP-9 nos queratinócitos. Os melanócitos localizados na epiderme foram as células presentes em nevos melanocíticos que tiveram um maior aumento das MMPs-2 e -9 com a UVB. As linhagens celulares localizadas na derme (melanócitos dérmicos, fibroblastos e células endoteliais) também apresentaram um aumento da expressão nos lados irradiados, porém com diferenças de escores inferiores, talvez pela menor penetração da radiação UVB nessa profundidade e pela escassa quantidade de UVA emitida pelo aparelho utilizado. Uma possível explicação para que a diferença de escores da expressão da MMP-2, encontrada nos queratinócitos irradiados, seja em níveis semelhantes ao das células do derma e para que a diferença na MMP-9 dos queratinócitos não tenha atingido uma significância estatística, pode estar relacionada ao fenômeno da alimentação autócrina que as MMPs são capazes de realizar em queratinócitos. Assim, hipoteticamente, a expressão de gelatinases do lado irradiado poderia influenciar a mesma no lado não irradiado, desta forma reduzindo as diferenças (80, 84).

A obtenção de um escore médio entre três observadores diminui a chance de um viés de aferição quanto à intensidade da expressão. Os índices de ICC observados foram considerados bons ou regulares na maioria das variáveis; não obstante, algumas tiveram uma homogeneidade de respostas baixa, fato que pode sugerir uma limitação do método de imunoistoquímica na avaliação da expressão das MMPs teciduais de nevos melanocíticos.

A realização de outros estudos, utilizando o método da zimografia, que diferencia as formas de gelatinases inativas das ativas talvez possa contribuir para um melhor entendimento dos possíveis papéis desempenhados pelas metaloproteinases -2 e -9,

presentes em nevos, após a irradiação com UVB, em eventuais processos de transformação de nevos em melanomas, bem como para elucidar os pouco conhecidos mecanismos de desenvolvimento e invasão dessas neoplasias.

### **Agradecimentos**

Ao Dr. José Carlos Mariante pela cessão do material biológico de seu estudo; à bióloga Ivana Höfke de Souza Gallota pelo auxílio com as técnicas de imunistoquímica; ao Dr. Mário Bernardes Wagner pelo apoio no tratamento estatístico dos dados; à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela ajuda auxílio financeira, concedida sob a forma de bolsa de estudos de pós-graduação (mestrado).



**REFERÊNCIAS**

1. Thompson JF, Scolyer RA, Kefford RF. Cutaneous melanoma. *Lancet* 2005;365(9460):687-701.
2. Tsao H, Bevona C, Goggins W, Quinn T. The transformation rate of moles (melanocytic nevi) into cutaneous melanoma: a population-based estimate. *Arch Dermatol* 2003;139(3):282-8.
3. Ruiz Lascano A, Kuznitzky R, Cuestas E, Mainardi C, Albertini R, Borello A, *et al.* Risk factors for cutaneous melanoma: case-control study in Cordoba, Argentina. *Medicina* 2004;64(6):504-8.
4. Garbe C, Buttner P, Weiss J, Soyer HP, Stocker U, Kruger S, *et al.* Risk factors for developing cutaneous melanoma and criteria for identifying persons at risk: multicenter case-control study of the Central Malignant Melanoma Registry of the German Dermatological Society. *J Invest Dermatol* 1994;102(5):695-9.
5. Katsambas A, Nicolaidou E. Cutaneous malignant melanoma and sun exposure. Recent developments in epidemiology. *Arch Dermatol* 1996;132(4):444-50.
6. Rokuhara S, Saida T, Oguchi M, Matsumoto K, Murase S, Oguchi S. Number of acquired melanocytic nevi in patients with melanoma and control subjects in Japan: Nevus count is a significant risk factor for nonacral melanoma but not for acral melanoma. *J Am Acad Dermatol* 2004;50(5):695-700.
7. Abarca JF, Casiccia CC. Skin cancer and ultraviolet-B radiation under the Antarctic ozone hole: southern Chile, 1987-2000. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2002;18(6):294-302.
8. Carli P, Biggeri A, Giannotti B. Malignant melanoma in Italy: risks associated with common and clinically atypical melanocytic nevi. *J Am Acad Dermatol* 1995;32(5 Pt 1):734-9.

9. Hall HI, Miller DR, Rogers JD, Bewerse B. Update on the incidence and mortality from melanoma in the United States. *J Am Acad Dermatol* 1999;40(1):35-42.
10. Martin RC, Robinson E. Cutaneous melanoma in Caucasian New Zealanders: 1995-1999. *ANZ J Surg* 2004;74(4):233-7.
11. Tyler I, Rivers JK, Shoveller JA, Blum A. Melanoma detection in British Columbia, Canada. *J Am Acad Dermatol* 2005;52(1):48-54.
12. Levi F, Te VC, Randimbison L, La Vecchia C. Trends in incidence of various morphologies of malignant melanoma in Vaud and Neuchatel, Switzerland. *Melanoma Res* 2005;15(1):73-5.
13. Tabenkin H, Tamir A, Sperber AD, Shapira M, Shvartzman P. A case-control study of malignant melanoma in Israeli kibbutzim. *Isr Med Assoc J* 1999;1(3):154-7.
14. Balzi D, Carli P, Giannotti B, Paci E, Buiatti E. Cutaneous melanoma in the Florentine area, Italy: incidence, survival and mortality between 1985 and 1994. *Eur J Cancer Prev* 2003;12(1):43-8.
15. Diffey BL. The future incidence of cutaneous melanoma within the UK. *Br J Dermatol* 2004;151(4):868-72.
16. Marks R. Epidemiology of melanoma. *Clin Exp Dermatol* 2000;25(6):459-63.
17. Darlington S, Siskind V, Green L, Green A. Longitudinal study of melanocytic nevi in adolescents. *J Am Acad Dermatol* 2002;46(5):715-22.
18. Kanzler MH, Mraz-Gernhard S. Primary cutaneous malignant melanoma and its precursor lesions: diagnostic and therapeutic overview. *J Am Acad Dermatol* 2001;45(2):260-76.
19. Holly EA, Kelly JW, Shpall SN, Chiu SH. Number of melanocytic nevi as a major risk factor for malignant melanoma. *J Am Acad Dermatol* 1987;17(3):459-68.
20. Bataille V, Grulich A, Sasieni P, Swerdlow A, Newton Bishop J, McCarthy W, *et al.* The association between naevi and melanoma in populations with different levels of sun

- exposure: a joint case-control study of melanoma in the UK and Australia. *Br J Cancer* 1998;77(3):505-10.
21. Kaddu S, Smolle J, Zenahlik P, Hofmann-Wellenhof R, Kerl H. Melanoma with benign melanocytic naevus components: reappraisal of clinicopathological features and prognosis. *Melanoma Res* 2002;12(3):271-8.
22. Tannous ZS, Mihm MC Jr, Sober AJ, Duncan LM. Congenital melanocytic nevi: clinical and histopathologic features, risk of melanoma, and clinical management. *J Am Acad Dermatol* 2005;52(2):197-203.
23. Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS, Pasquini P, Picconi O, Boyle P, *et al.* Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: II. Sun exposure. *Eur J Cancer* 2005;41(1):45-60.
24. Tronnier M, Smolle J, Wolff HH. Ultraviolet irradiation induces acute changes in melanocytic nevi. *J Invest Dermatol* 1995;104(4):475-8.
25. Tronnier M, Wolff HH. UV-irradiated melanocytic nevi simulating melanoma in situ. *Am J Dermatopathol* 1995;17(1):1-6.
26. Tronnier M, Rudolph P, Koser T, Raasch B, Brinckmann J. One single erythemagenic UV irradiation is more effective in increasing the proliferative activity of melanocytes in melanocytic naevi compared with fractionally applied high doses. *Br J Dermatol* 1997;137(4):534-9.
27. Nagase H, Woessner JF Jr. Matrix Metalloproteinases. *J Biol Chem* 1999, 274:21491-4.
28. Gillard JA, Reed MW, Buttle D, Cross SS, Brown NJ. Matrix metalloproteinase activity and immunohistochemical profile of matrix metalloproteinase-2 and -9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 during human dermal wound healing. *Wound Repair Regen* 2004;12(3):295-304.
29. de Almeida H Jr, Zigrino P, Muller F, Krieg T, Korge B, Mauch C. Human scalp dermal papilla and fibrous sheath cells have a different expression profile of matrix

metalloproteinases in vitro when compared to scalp dermal fibroblasts. *Arch Dermatol Res* 2005;1-6. (epub ahead of print)

30. Fisher GJ, Wang Z, Datta SC, Varani J, Kang S, Voorhees JJ. Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light. *N Engl J Med* 1997; 337(20):1419-28.

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

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

33. Hofmann UB, Westphal JR, Waas ET, Zendman AJ, Cornelissen IM, Ruiter DJ, *et al.* 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.

34. Hofmann UB, Westphal JR, Van Muijen GN, Ruiter DJ. Matrix metalloproteinases in human melanoma. *J Invest Dermatol* 2000;115(3):337-44.

35. Kobayashi T, Hattori S, Shinkai H. Matrix metalloproteinases-2 and -9 are secreted from human fibroblasts. *Acta Derm Venereol* 2003;83(2):105-7.

36. Brenneisen P, Sies H, Scharfetter-Kochanek K. Ultraviolet-B irradiation and matrix metalloproteinases: from induction via signaling to initial events. *Ann N Y Acad Sci* 2002;973:31-43

37. Murphy G, Knauper V, Atkinson S, Butler G, English W, Hutton M, *et al.* Matrix metalloproteinases in arthritic disease. *Arthritis Res* 2002;4(3):S39-49.

38. Nagase H, Barrett AJ, Woessner JF Jr. Nomenclature and glossary of the matrix metalloproteinases. *Matrix Suppl* 1992;1:421-4.

39. Lauer-Fields JL, Sritharan T, Stack MS, Nagase H, Fields GB. Selective hydrolysis of triple-helical substrates by matrix metalloproteinase-2 and -9. *J Biol Chem* 2003;278(20):18140-5.
40. Bjorklund M, Koivunen E. Gelatinase-mediated migration and invasion of cancer cells. *Biochim Biophys Acta* 2005;1755(1):37-69.
41. Gaiotto MA, Focchi J, Ribalta JL, Stavale JN, Baracat EC, Lima GR, *et al.* Comparative study of MMP-2 (matrix metalloproteinase 2) immune expression in normal uterine cervix, intraepithelial neoplasias, and squamous cells cervical carcinoma. *Am J Obstet Gynecol* 2004;190(5):1278-82.
42. Ondo K, Sugio K, Yamazaki K, Yamaguchi M, Yano T, Yoshino I, *et al.* The significance of serum active matrix metalloproteinase-9 in patients with non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2004;46(2):205-13.
43. Yamamoto H, Vinitketkumnuen A, Adachi Y, Taniguchi H, Hirata T, Miyamoto N, *et al.* Association of matrilysin-2 (MMP-26) expression with tumor progression and activation of MMP-9 in esophageal squamous cell carcinoma. *Carcinogenesis* 2004;25(12):2353-60.
44. Lin SY, Wang YY, Sheu WH. Preoperative plasma concentrations of vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinase 9 are associated with stage progression in papillary thyroid cancer. *Clin Endocrinol* 2003;58(4):513-8.
45. Liu WW, Zeng ZY, Wu QL, Hou JH, Chen YY. Overexpression of MMP-2 in laryngeal squamous cell carcinoma: a potential indicator for poor prognosis. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2005;132(3):395-400.
46. Mook OR, Frederiks WM, Van Noorden CJ. The role of gelatinases in colorectal cancer progression and metastasis. *Biochim Biophys Acta* 2004;1705(2):69-89.
47. Hofmann UB, Eggert AA, Blass K, Brocker EB, 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(23):8221-5.

48. Ntayi C, Hornebeck W, Bernard P. Influence of cultured dermal fibroblasts on human melanoma cell proliferation, matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) expression and invasion in vitro. *Arch Dermatol Res* 2003;295(6):236-41.

49. Ohnishi Y, Tajima S, Ishibashi 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.

50. Kurschat P, Wickenhauser C, Groth W, Krieg T, Mauch C. Identification of activated matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) as the main gelatinolytic enzyme in malignant melanoma by in situ zymography. *J Pathol* 2002;197(2):179-87.

51. Vaisanen A, Tuominen H, Kallioinen M, Turpeenniemi-Hujanen T. Matrix metalloproteinase-2 (72 kD type IV collagenase) expression occurs in the early stage of human melanocytic tumour progression and may have prognostic value. *J Pathol* 1996;180(3):283-9.

52. 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.

53. Van Den Oord JJ, Paemen L, Opednakker G, De Wolf-Peeters C. Expression of gelatinase B and the extracellular matrix metalloproteinase inducer EMMPRIN in benign and malignant pigment cell lesions of the skin. *Am J Pathol* 1997;151(3):665-70.

54. Koivukangas V, Kallioinen M, Autio-Harmainen H, Oikarinen A. UV irradiation induces the expression of gelatinases in human skin in vivo. *Acta Derm Venereol* 1994;74(4):279-82.

55. Onoue S, Kobayashi T, Takemoto Y, Sasaki I, Shinkai H. Induction of matrix metalloproteinase-9 secretion from human keratinocytes in culture by ultraviolet B irradiation. *J Dermatol Sci* 2003;33(2):105-11.
56. Krengel S, Alexander M, Brinckmann J, Tronnier M. MMP-2, TIMP-2 and MT1-MMP are differentially expressed in lesional skin of melanocytic nevi and their expression is modulated by UVB-light. *J Cutan Pathol* 2002;29(7):390-6.
57. Mariante JC. Alterações Clínicas, dermatoscópicas, histopatológicas e imuno-histoquímicas de nevos melanocíticos irradiados com raios ultravioleta B[dissertação]. Porto Alegre(RS): UFRGS;2003
58. Hsu SM, Raine L, Fanger H. The use of antiavidin antibody and avidin-biotin-peroxidase complex in immunoperoxidase technics. *Am J Clin Pathol* 1981;75(6):816-21.
59. Bonamigo RR. A expressão imunoistoquímica das metaloproteinasas -2 e -9 da matriz na rosácea inflamatória[tese]. Porto Alegre(RS): UFRGS; 2003.
60. Redondo P, Lloret P, Idoate M, Inoges S. Expression and serum levels of MMP-2 and MMP-9 during human melanoma progression. *Clin Exp Dermatol* 2005; 30:541-5.
61. Hofmann UB, Westphal JR, Zendman AJ, Becker JC, Ruiter DJ, van Muijen GN. Expression and activation of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and its co-localization with membrane-type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) correlate with melanoma progression. *J Pathol* 2000;191(3):245-56.
62. Schnaeker EM, Ossig R, Ludwig T, Dreier R, Oberleithner H, Wilhelmi M, *et al.* Microtubule-dependent matrix metalloproteinase-2/matrix metalloproteinase-9 exocytosis: prerequisite in human melanoma cell invasion. *Cancer Res* 2004;64(24):8924-31.
63. Fisher GJ, Datta SC, Talwar HS, Wang ZQ, Varani J, Kang S, *et al.* Molecular basis of sun-induced premature skin ageing and retinoid antagonism. *Nature* 1996;379(6563):335-9.

64. Kozak I, Klisenbauer D, Juhas T. UV-B induced production of MMP-2 and MMP-9 in human corneal cells. *Physiol Res* 2003;52(2):229-34.
65. Kupper TS, Chua AO, Flood P, Mcguire J, Gubler U. Interleukin 1 gene expression in cultured human keratinocytes is augmented by ultraviolet irradiation. *J Clin Invest* 1987;80(2):430-6.
66. Kobayashi T, Hattori S, Nagai Y, Sakuraoka K, Nishikawa T. Secretion of different types of gelatinases from cultured human keratinocytes. *J Dermatol* 1997;24(4):213-6.
67. Bizik J, Bessou S, Felnerova D, Vaheiri A, Taieb A. The proteolytic potential of normal human melanocytes: comparison with other skin cells and melanoma cell lines. *Pigment Cell Res* 1996;9(5):255-64.
68. Lei TC, Vieira WD, Hearing VJ. In vitro migration of melanoblasts requires matrix metalloproteinase-2: implications to vitiligo therapy by photochemotherapy. *Pigment Cell Res* 2002;15(6):426-32.
69. Wu CS, Yu CL, Wu CS, Lan CC, Yu HS. Narrow-band ultraviolet-B stimulates proliferation and migration of cultured melanocytes. *Exp Dermatol* 2004;13(12):755-63.
70. Gontier E, Cario-Andre M, Vergnes P, Bizik J, Surleve-Bazeille JE, Taieb A. The 'Abtropfung phenomenon' revisited: Dermal nevus cells from congenital nevi cannot activate matrix metalloproteinase 2 (MMP-2). *Pigment Cell Res* 2003;16(4):366-73.
71. Vacca A, Moretti S, Ribatti D, Pellegrino A, Pimpinelli N, Bianchi B, *et al.* Progression of mycosis fungoides is associated with changes in angiogenesis and expression of the matrix metalloproteinases 2 and 9. *Eur J Cancer* 1997;33(10):1685-92.
72. Mirastschijski U, Impola U, Jahkola T, Karlsmark T, AGren MS, Saarialho-Kere U. Ectopic localization of matrix metalloproteinase-9 in chronic cutaneous wounds. *Hum Pathol* 2002;33(3):355-64.



73. Jackson CJ, Nguyen M. Human microvascular endothelial cells differ from macrovascular endothelial cells in their expression of matrix metalloproteinases. *Int J Biochem Cell Biol* 1997;29(10):1167-77.
74. Lamoreaux WJ, Fitzgerald ME, Reiner A, Hasty KA, Charles ST. Vascular endothelial growth factor increases release of gelatinase A and decreases release of tissue inhibitor of metalloproteinases by microvascular endothelial cells in vitro. *Microvasc Res* 1998;55(1):29-42.
75. Hirota A, Ebihara T, Kusubata M, Kobayashi M, Kobayashi K, Kuwaba K, *et al.* Collagen of chronically inflamed skin is over-modified and upregulates secretion of matrix metalloproteinase 2 and matrix-degrading enzymes by endothelial cells and fibroblasts. *J Invest Dermatol* 2003;121(6):1317-25.
76. Kut C, Hornebeck W, Groult N, Redziniack G, Godeau G, Pellat B. Influence of successive and combined ultraviolet A and B irradiations on matrix metalloelastases produced by human dermal fibroblasts in culture. *Cell Biol Int* 1997;21(6):347-52.
77. Ohnishi Y, Tajima S, Akiyama M, Ishibashi A, Kobayashi R, Horii I. Expression of elastin-related proteins and matrix metalloproteinases in actinic elastosis of sun-damaged skin. *Arch Dermatol Res* 2000;292(1):27-31.
78. Kossodo S, Wong WR, Simon G, Kochevar IE. Effects of UVR and UVR-induced cytokines on production of extracellular matrix proteins and proteases by dermal fibroblasts cultured in collagen gels%. *Photochem Photobiol* 2004;79(1):86-93.
79. Kobayashi T, Onoda N, Takagi T, Hori H, Hattori S, Nagai Y, *et al.* Immunolocalizations of human gelatinase (type IV collagenase, MMP-9) and TIMP (tissue inhibitor of metalloproteinases) in normal epidermis and some epidermal tumors. *Arch Dermatol Res* 1996;288(5-6):239-44.
80. Kobayashi T, Shinkai H. Leptomycin B reduces matrix metalloproteinase-9 expression and suppresses cutaneous inflammation. *J Invest Dermatol* 2005;124(2):331-7.

81. Chan VT, Zhang DN, Nagarayapu U, Hultquist K, Romero LI, Herron GS. Membrane-type matrix metalloproteinases in human dermal microvascular endothelial cells: expression and morphogenetic correlation. *J Invest Dermatol* 1998;111(6):1153-9.
82. Nguyen M, Arkell J, Jackson CJ. Active and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-free gelatinase B accumulates within human microvascular endothelial vesicles. *J Biol Chem* 1998;273(9):5400-4.
83. Han YP, Tuan TL, Hughes M, Wu H, Garner WL. Transforming growth factor-beta - and tumor necrosis factor-alpha -mediated induction and proteolytic activation of MMP-9 in human skin. *J Biol Chem* 2001;276(25):22341-50.
84. Kratz G, Jansson K, Gidlund M, Haegerstrand A. Keratinocyte conditioned medium stimulates type IV collagenase synthesis in cultured human keratinocytes and fibroblasts. *Br J Dermatol* 1995;133(6):842-6.

TABELA 1: Análise semi-quantitativa da MMP-2 nos lados irradiados e não irradiados.

MMP-2	Lados irradiados				Lados não irradiados				p
	Média (ELI)	Desvio padrão	Mediana	ICC	Média (ELNI)	Desvio padrão	Mediana	ICC	
QUER	1,56	0,72	1,67	0,71	1,25	0,76	1,33	0,62	< 0,0001
MELB	1,70	0,67	1,67	0,54	1,04	0,61	1,00	0,45	< 0,0001
MELD	1,32	0,56	1,33	0,35	0,94	0,68	1,00	0,53	< 0,0001
ENDO	1,03	0,62	1,00	0,47	0,77	0,60	0,67	0,46	< 0,0001
FIBR	1,11	0,62	1,00	0,47	0,90	0,56	0,83	0,55	< 0,0001

MMP-2: metaloproteinase-2 da matriz; ELI: escore lado irradiado; ELNI: escore lado não irradiado; ICC: "intra-class correlation coefficient"; QUER: queratinócitos; MELB: melanócitos epidérmicos; MELD: melanócitos dérmicos; ENDO: células endoteliais; FIBR: fibroblastos.

TABELA 2: Análise semi-quantitativa da MMP-9 nos lados irradiados e não irradiados.

MMP-9	Lados irradiados				Lados não irradiados				p
	Média (ELI)	Desvio padrão	Mediana	ICC	Média (ELNI)	Desvio padrão	Mediana	ICC	
QUER	2,39	0,80	2,67	0,75	2,18	0,90	2,67	0,79	0,072
MELB	1,83	0,76	2,00	0,71	1,40	0,86	1,17	0,73	< 0,0001
MELD	1,67	0,78	1,67	0,58	1,44	0,84	1,50	0,51	< 0,0001
ENDO	1,83	0,91	2,00	0,62	1,59	0,94	1,67	0,64	0,004
FIBR	1,79	0,79	1,67	0,50	1,56	0,76	1,67	0,52	0,012

MMP-9: metaloproteinase-9 da matriz; ELI: escore lado irradiado; ELNI: escore lado não irradiado; ICC: "intraclass correlation coefficient"; QUER: queratinócitos; MELB: melanócitos epidérmicos; MELD: melanócitos dérmicos; ENDO: células endoteliais; FIBR: fibroblastos.

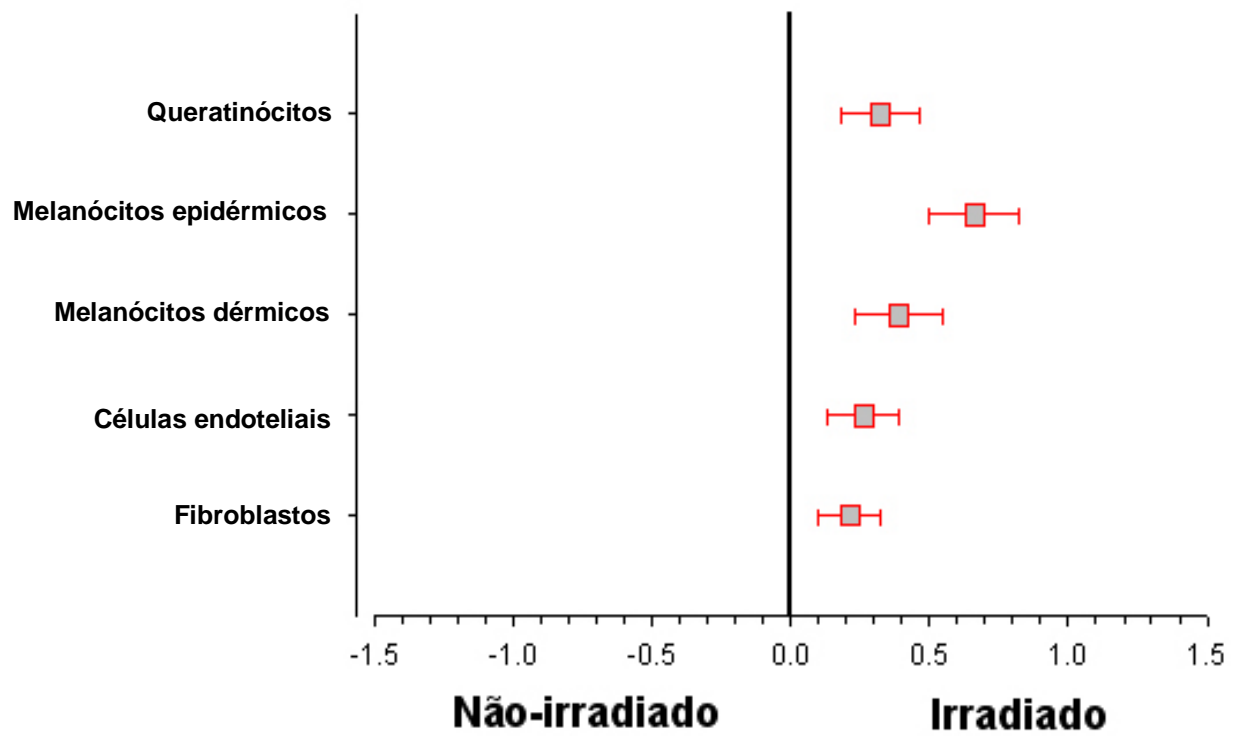


FIGURA 1: Gráfico das diferenças de escores médios (ELI - ELNI) de expressão imunohistoquímica de MMP-2 observados entre os lados não irradiados e irradiados.

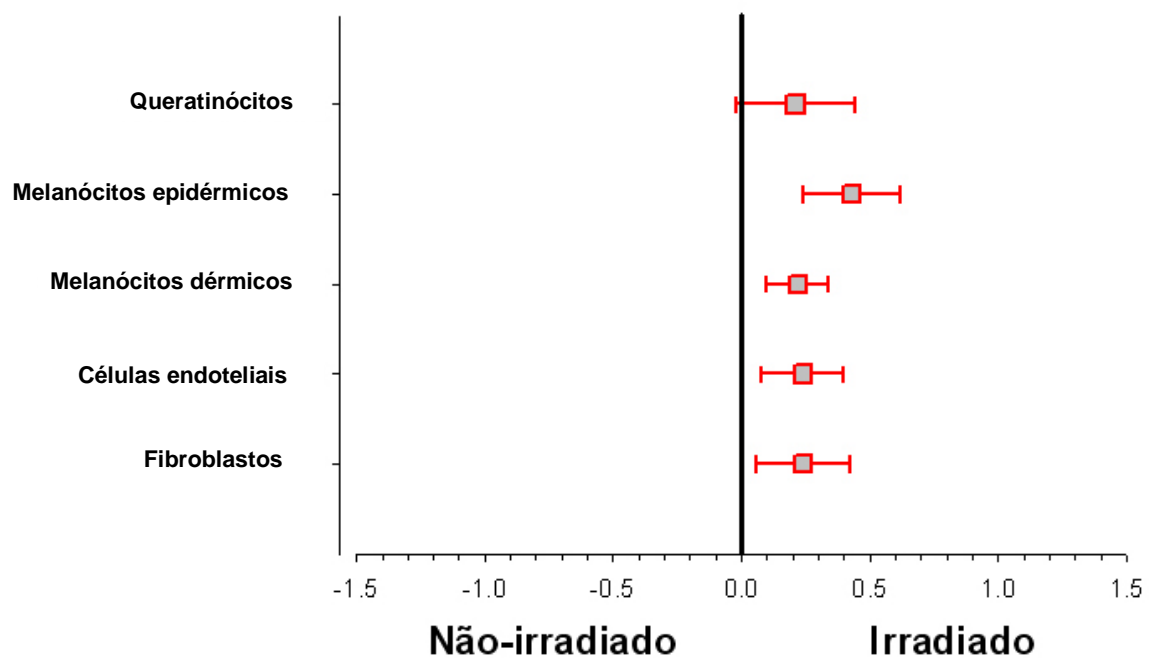


FIGURA 2: Gráfico das diferenças de escores médios (ELI - ELNI) de expressão imunohistoquímica de MMP-9 observados entre os lados não irradiados e irradiados.

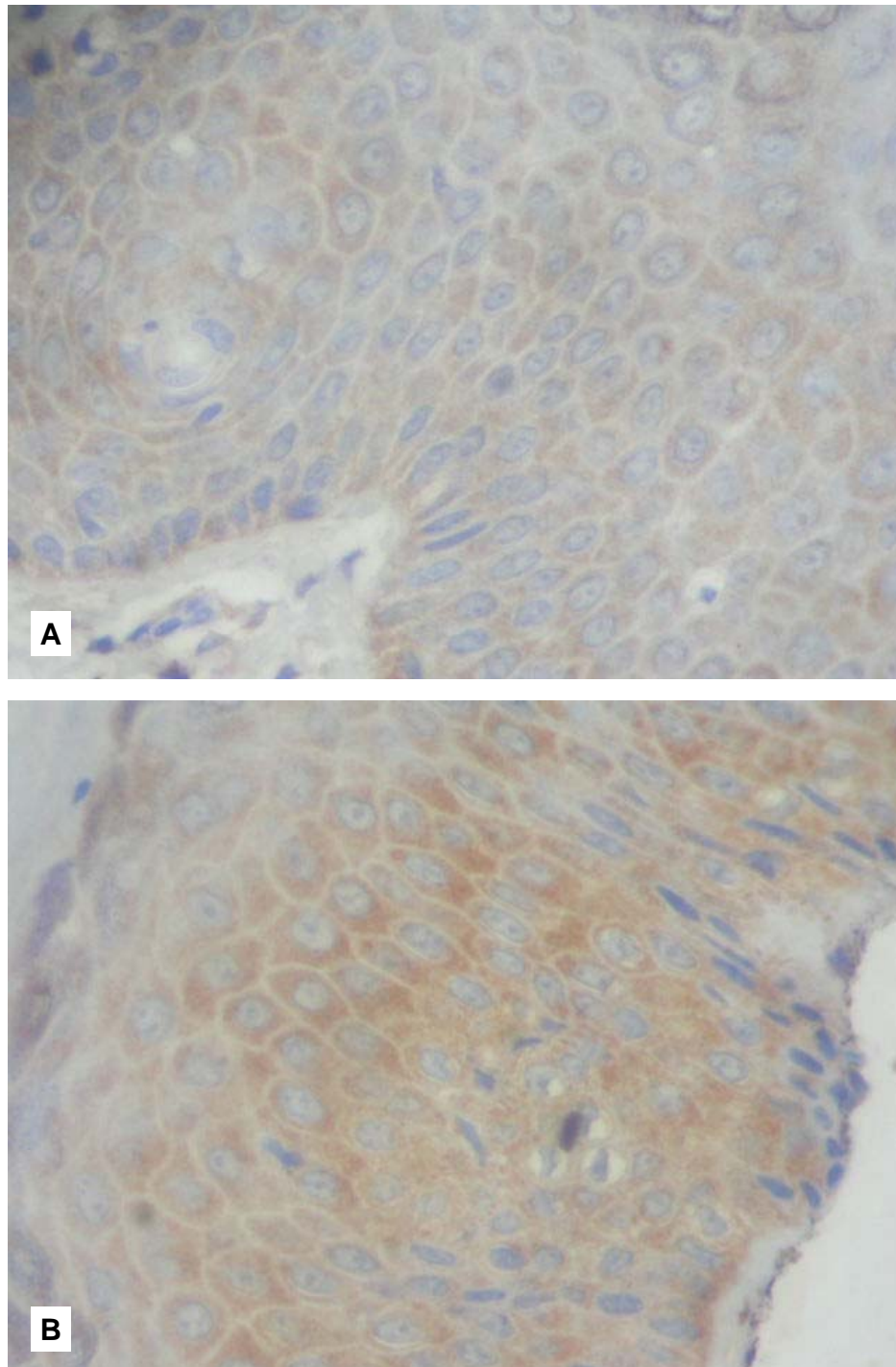


FIGURA 3: A. Expressão imunoistoquímica (1+) de MMP-2 nos queratinócitos de lado não irradiado; B. Expressão imunoistoquímica (2+) de MMP-2 nos queratinócitos de lado irradiado. (no original, x 400, imunoperoxidase – DAB)

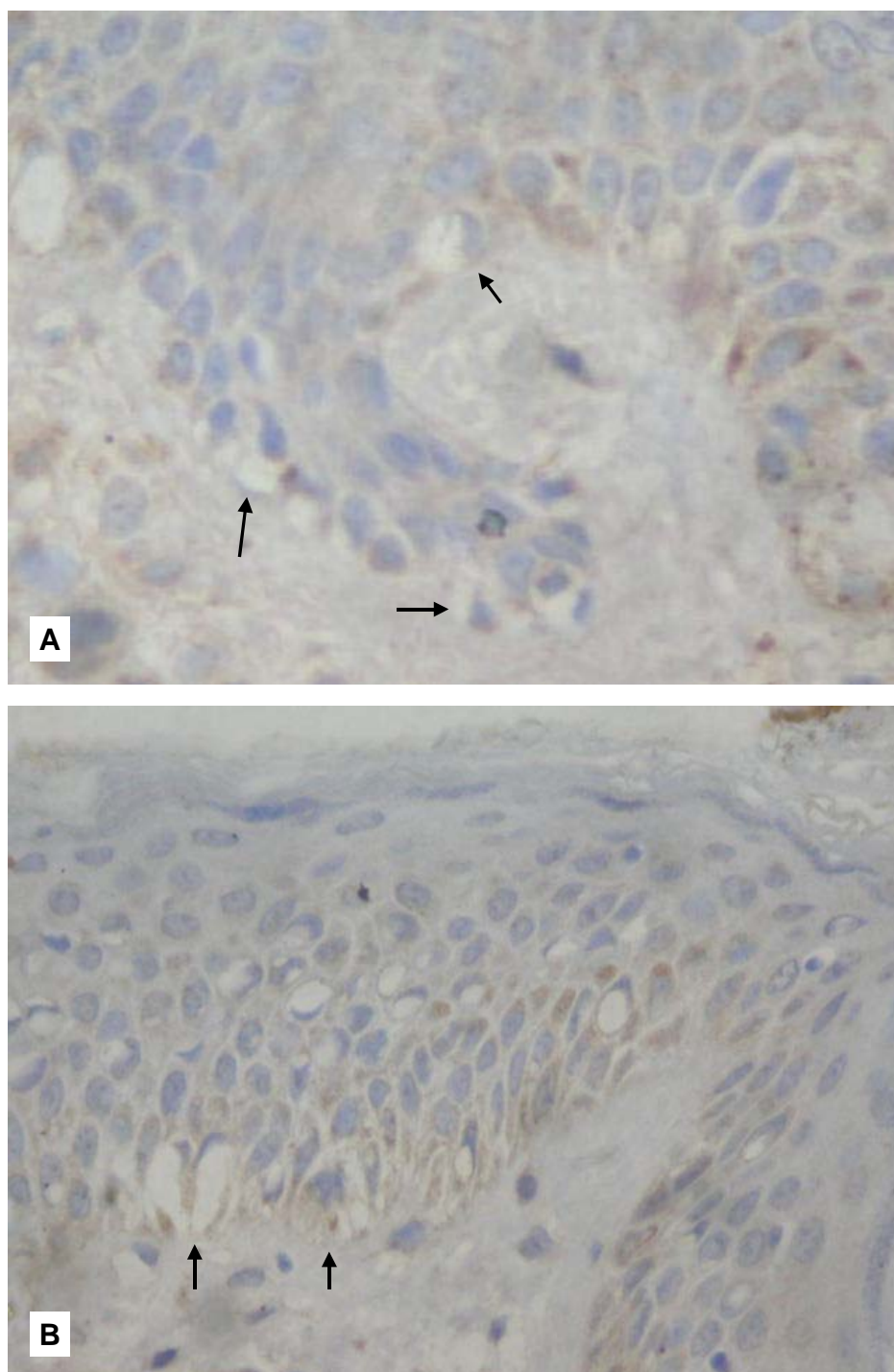


FIGURA 4: A. Expressão imunoistoquímica (1+) de MMP-2 em melanócitos epidérmicos de lado não irradiado (→); B. Expressão imunoistoquímica (2+) de MMP-2 em melanócitos epidérmicos de lado irradiado (→). (no original, x 400, imunoperoxidase – DAB)



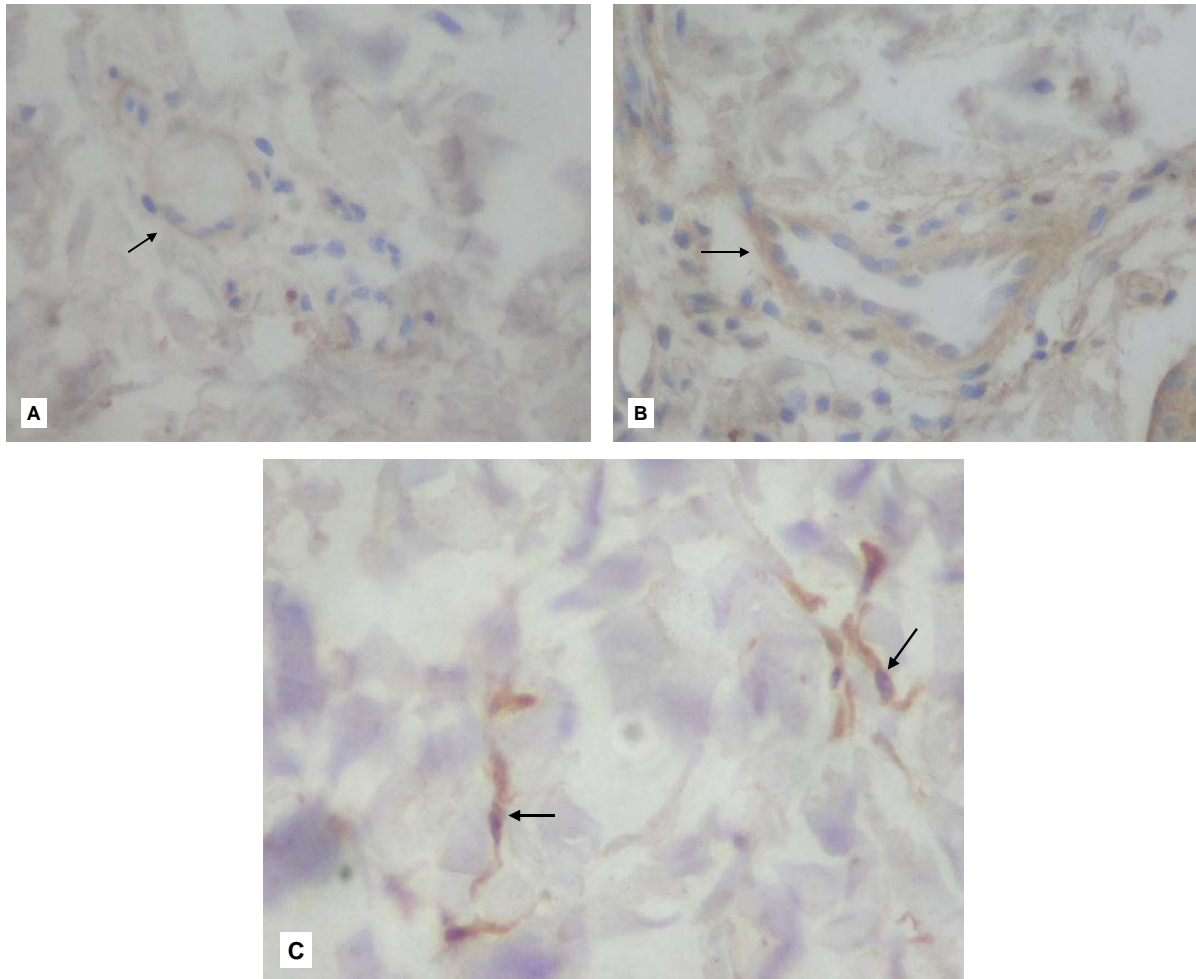


FIGURA 5: A. Expressão imunoistoquímica (1+) de MMP-9 em células endoteliais de lado não irradiado (→); B. Expressão imunoistoquímica (2+) de MMP-9 em células endoteliais de lado irradiado (→); C. Expressão imunoistoquímica (3+) de MMP-9 em fibroblastos de lado irradiado (→).(no original, x 400, imunoperoxidase – DAB)





**12.3. ANEXO C:** Fotografia do exame histopatológico de nevo melanócito irradiado.

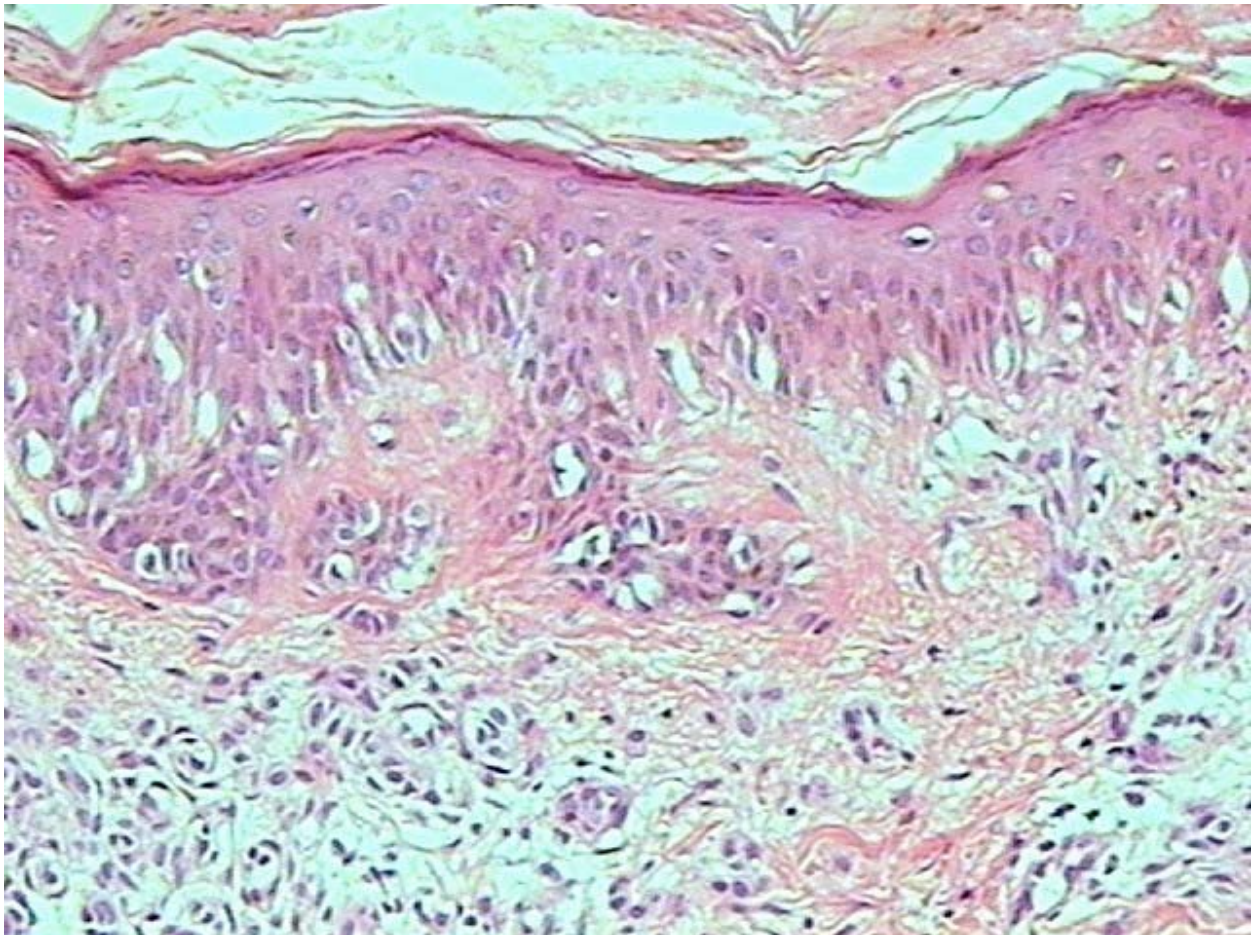


FIGURA C1: Hiperplasia de melanócitos com aumento de núcleos e citoplasma. (no original, x 100, H -E)

**12.3. ANEXO D:** Fotografias das lâminas de imunohistoquímica das MMP-2 e -9 nos lados irradiados e não irradiados.

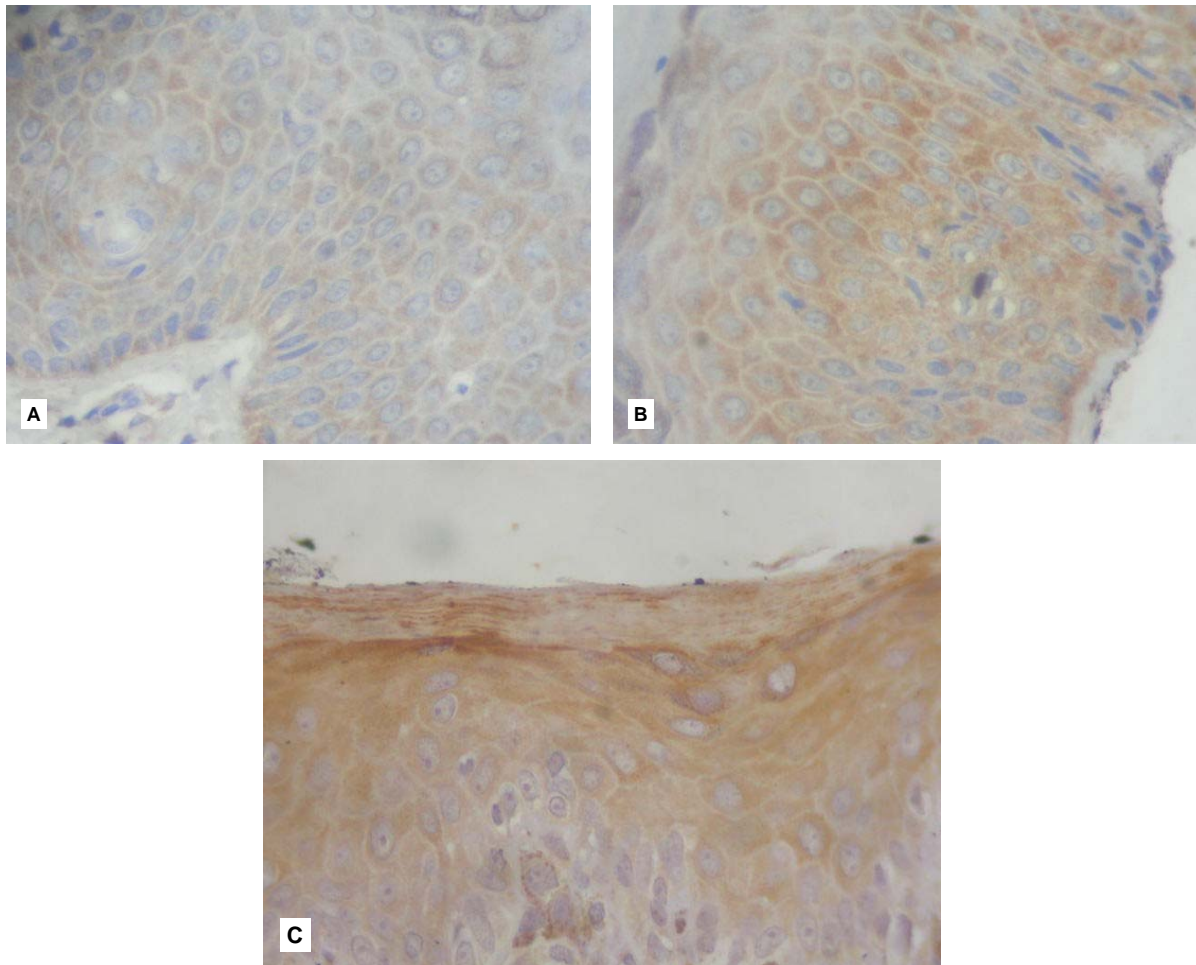


FIGURA D1: A. Expressão imunohistoquímica (1+) de MMP-2 nos queratinócitos de lado não irradiado; B. Expressão imunohistoquímica (2+) de MMP-2 nos queratinócitos de lado irradiado; C. Expressão imunohistoquímica (3+) de MMP-9 nos queratinócitos de lado irradiado. (no original, x 400, imunoperoxidase – DAB)

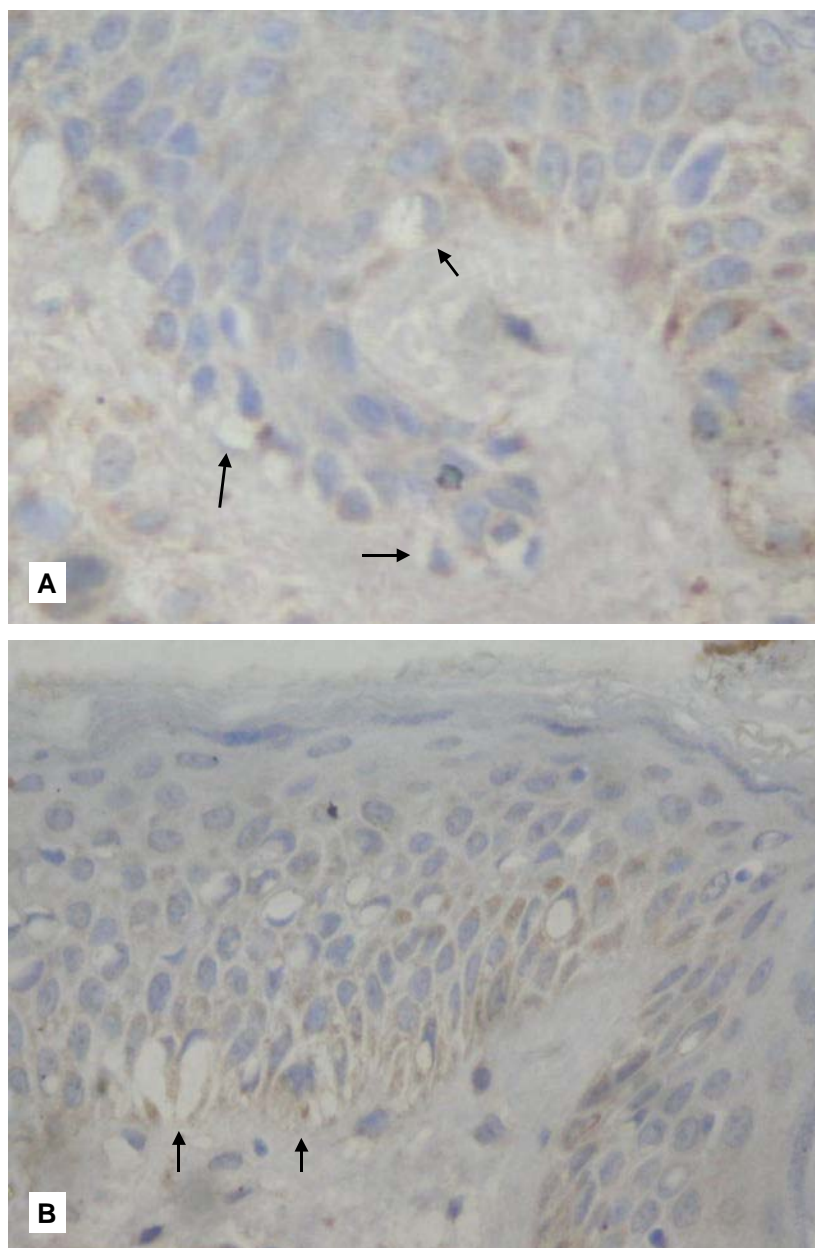


FIGURA D2: A. Expressão imunoistoquímica (1+) de MMP-2 em melanócitos epidérmicos de lado não irradiado (→); B. Expressão imunoistoquímica (2+) de MMP-2 em melanócitos epidérmicos de lado irradiado (→). (no original, x 400, imunoperoxidase – DAB)

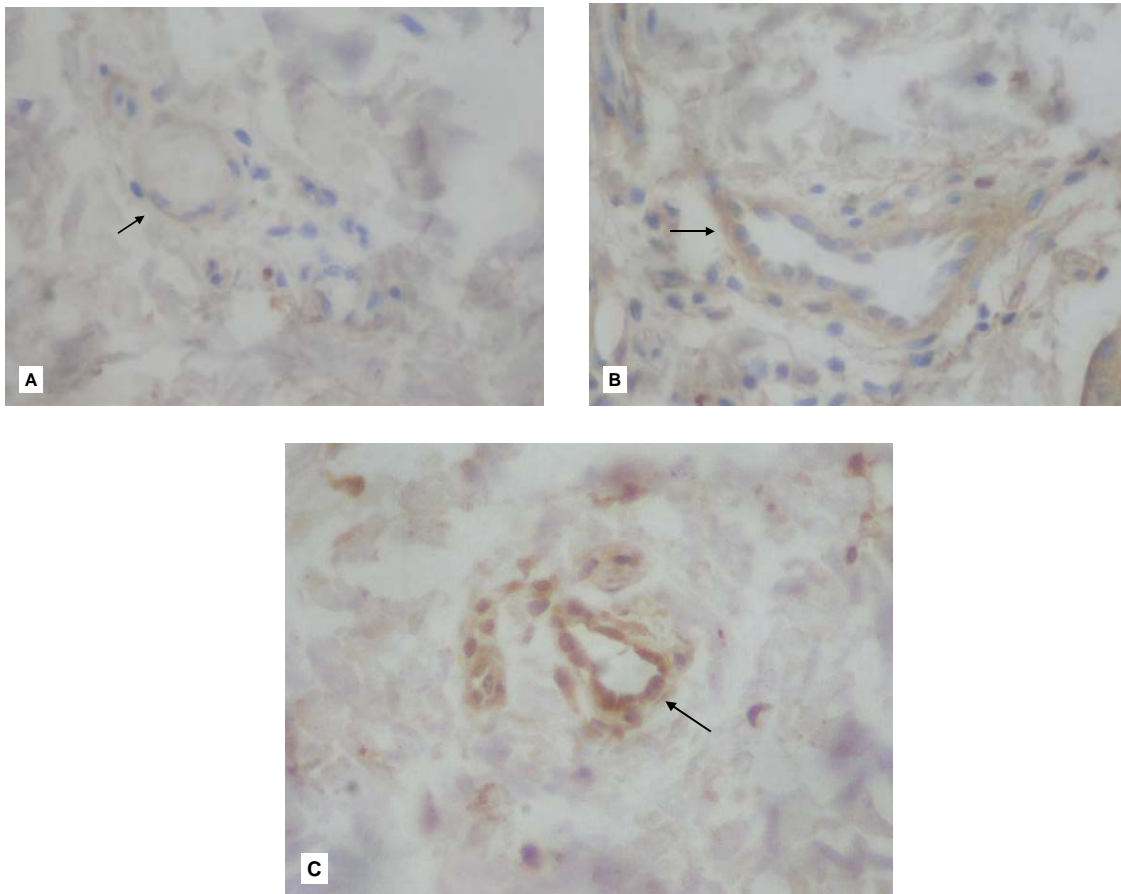


FIGURA D3: A. Expressão imunoistoquímica (1+) de MMP-9 em células endoteliais de lado não irradiado (→); B. Expressão imunoistoquímica (2+) de MMP-9 em células endoteliais de lado irradiado (→); C. Expressão imunoistoquímica (3+) de MMP-9 em células endoteliais de lado irradiado (→). (no original, x 400, imunoperoxidase – DAB)

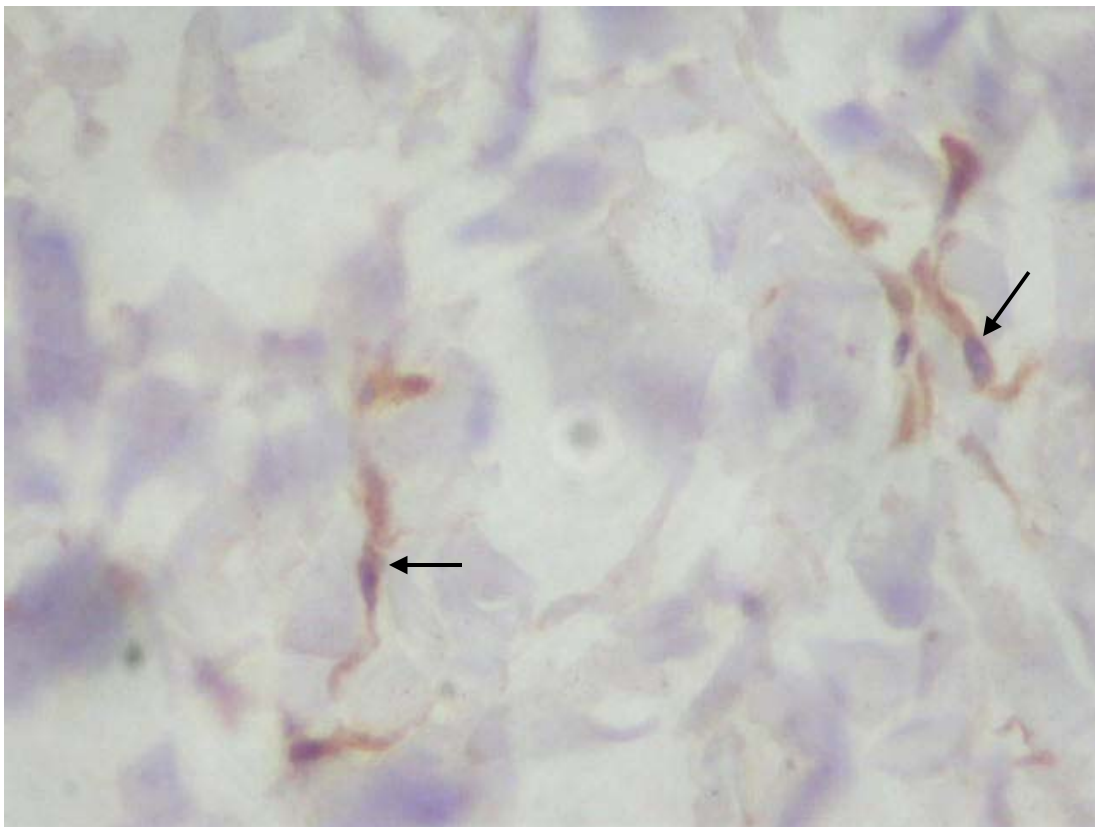


FIGURA D4: Expressão imunoistoquímica (3+) de MMP-9 em fibroblastos de lado irradiado (→). (no original, x 400, imunoperoxidase – DAB)



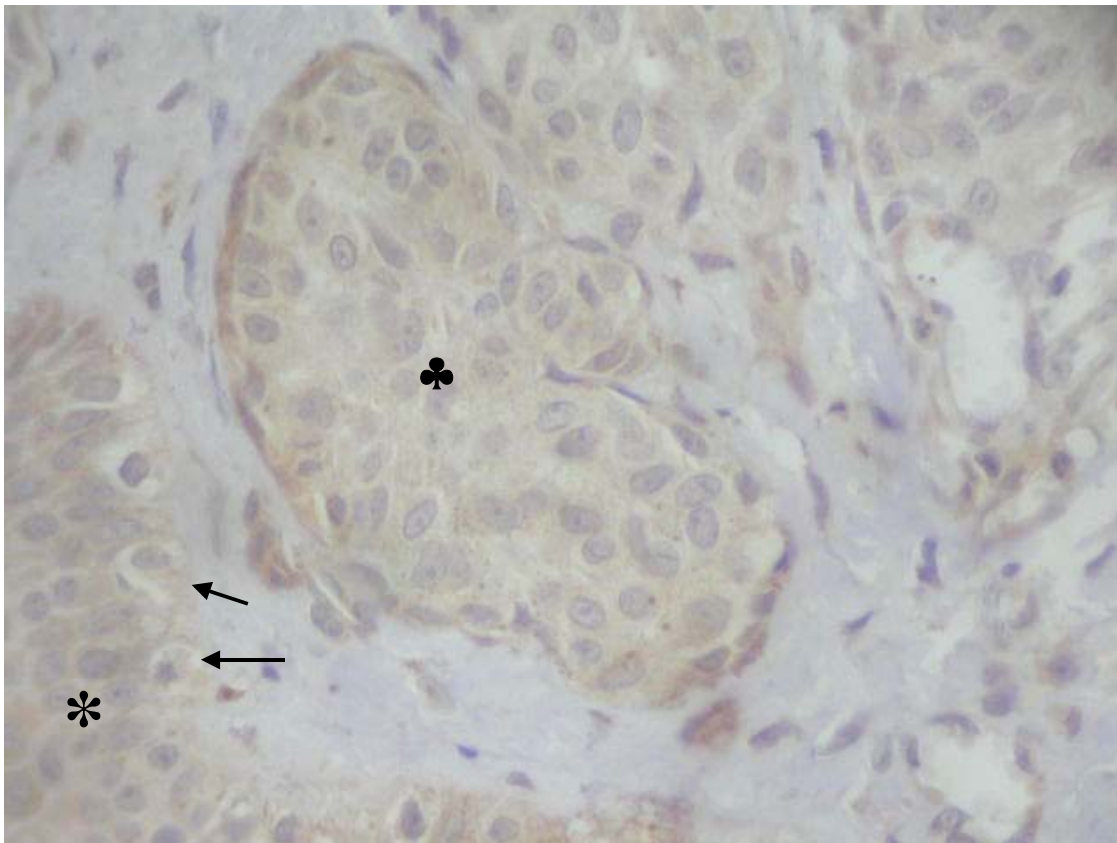


FIGURA D5: Expressão imunoistoquímica (2+, \*) de MMP-2 em queratinócitos, em melanócitos dérmicos (2+, ♣) e melanócitos epidérmicos (2+, →) de lado irradiado. (no original, x 400, imunoperoxidase – DAB)

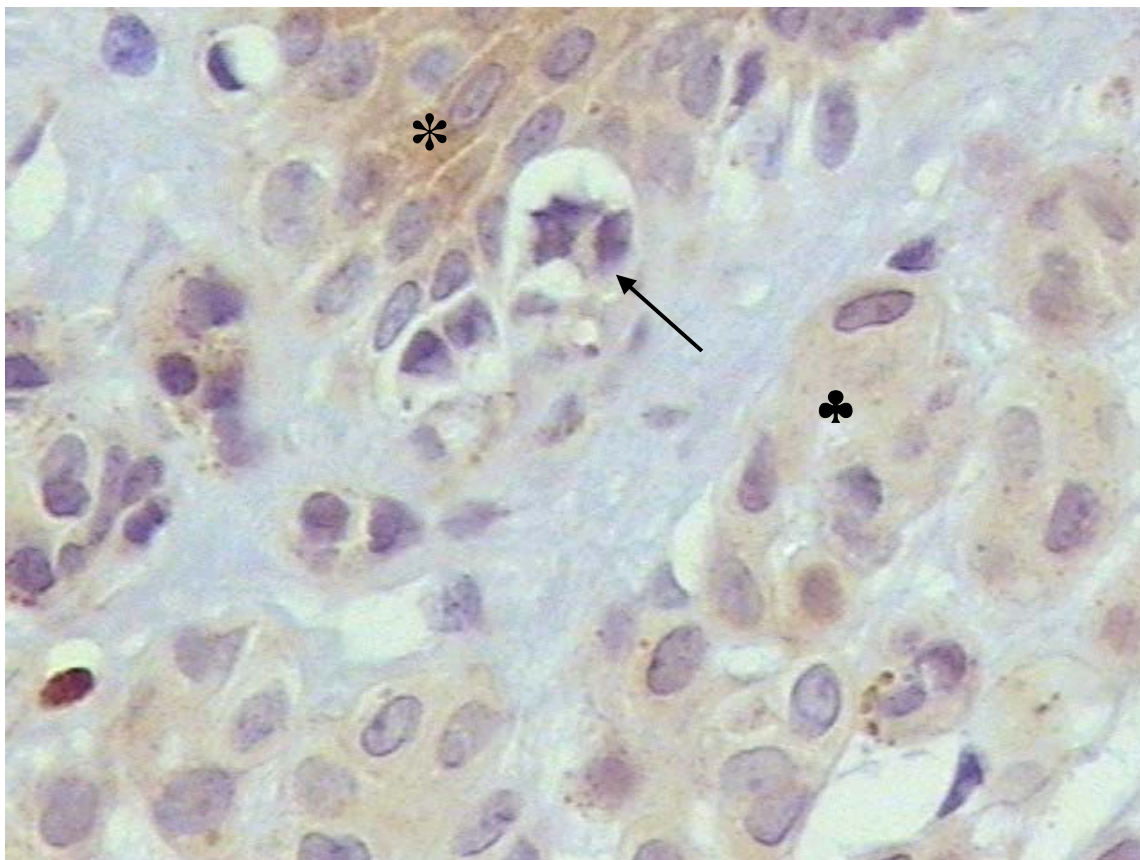


FIGURA D6: Expressão imunoistoquímica (3+, \*) de MMP-9 em queratinócitos, em melanócitos dérmicos (2+, ♣) e melanócitos epidérmicos (2+, →) de lado irradiado. (no original, x 400, imunoperoxidase – DAB)