

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

**A EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DAS METALOPROTEINASES-2 E -9  
DA MATRIZ NA ROSÁCEA INFLAMATÓRIA**

Renan Rangel Bonamigo

Orientador: Prof. Dr. Lucio Bakos

Co-Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Maria Isabel Albano Edelweiss

**Tese de Doutorado**

2003

*O presente estudo é dedicado aos pacientes portadores de doenças cutâneas inflamatórias crônicas da face, especialmente aos portadores de rosácea.*

**Agradecimento especial para  
Daniela, Francisco, Pedro,  
Ademar e Yuçara.**

## **AGRADECIMENTOS**

Ao professor Dr. Lucio Bakos, pela convivência estimuladora e pela transmissão de um ensinamento fundamental: o da necessidade de um aprendizado contínuo, reflexivo e científico sobre as questões dermatológicas. Agradeço também pelo modelo de educador e pesquisador que serve a todos envolvidos nessas missões.

À professora Dra. Maria Isabel Albano Edelweiss, exemplo de professora para todos os níveis, agradeço pelo carinho, interesse, dedicação e paciência com um iniciante em Patologia.

À bióloga Ivana Höfke de Souza Gallota e sua equipe, do laboratório Anticorpos de Niterói-RJ, pelo interesse na transmissão das técnicas em imunohistoquímica e pela presteza na resolução de problemas.

À professora Dra. Andréa Rodrigues C. Pires, professora de Patologia da Universidade Federal Fluminense e patologista do laboratório Anticorpos, que, com atenção e qualidade profissional, ajudou a demarcar alguns aspectos iniciais e fundamentais desta tese.

Ao Dr. André Cartell, dedicado professor de Dermatopatologia, pelo interesse e excelência científica do seu trabalho, o que muito contribuiu para a elaboração deste estudo.

Ao professor de Epidemiologia Dr. Mário Wagner, indispensável no auxílio bioestatístico e na própria reflexão sobre os resultados do trabalho.

Às colegas Dras. Carolina Peukert e Clarissa Berti, que doaram horas importantes de seus dias em período final da faculdade para obtenção de blocos,

lâminas e artigos da literatura, todos os quais se configuraram na estrutura basal do estudo.

À acadêmica de Medicina da UFRGS, Bárbara Zen, que acompanhou a difícil fase intermediária do estudo e que foi uma auxiliar polivalente e competente, atuando junto às consultas de seleção, nas revisões de literatura e na busca dos blocos e lâminas.

Aos funcionários dos Serviços de Patologia e de Dermatologia do HCPA, respectivamente, Sr. Adelmo Soliman e Sra. Bernadete Haameyer e às secretárias do consultório (Sras. Elisiane Mandicaju, Rosália Silva e Margarete Barbosa) pela disponibilidade e atenção nesses anos de trabalho em conjunto.

Ao Dr. Jorge Zanol e equipe e à Dra. Lúcia Kliemann e equipe, pela presteza e disponibilidade de seu tempo no auxílio da seleção de blocos e lâminas.

Aos médicos-residentes e estagiários do Ambulatório de Dermatologia Sanitária da Secretaria Estadual da Saúde-RS e do Hospital de Clínicas de Porto Alegre no período de 2000 e 2002 e ao acadêmico de Medicina da UFRGS, Cristiano Lange, por auxiliarem em encaminhamentos de novos pacientes e na busca de dados de antigos.

À professora Dra. Tania Cestari, que acompanhou ativamente a solicitação de auxílio à Fundação Médica do Rio Grande do Sul, incentivando o desenvolvimento do estudo.

À colega e amiga Dra. Márcia Salette Zampese e aos colegas de trabalho do Ambulatório de Dermatologia Sanitária da Secretaria Estadual da Saúde-RS, Drs. Gustavo Côrrea, Sérgio Ivan Torres Dornelles, Ana Kalil, Elisabeth Heydrich Dornelles, Nordon Poitvein, Cecília Cassal Corrêa e Vera Bauer, pela lembrança de encaminharem pacientes para o estudo.

À colega e médica-residente do Ambulatório de Dermatologia Sanitária-RS, Dra. Sabrina Stefani, pela presteza de seu apoio na busca por informações complementares importantes para essa tese.

Ao incansável amigo e mestre em Engenharia, Diego Nacci, por sua participação fundamental na organização e adequada formatação deste trabalho.

Aos chefes do Ambulatório de Dermatologia Sanitária da Secretaria Estadual da Saúde-RS, Drs. Ney Girão e João Tadeu Freitas da Costa, pelo incentivo à pesquisa e à assistência, indistintamente.

Aos colegas dermatologistas do Serviço de Dermatologia do HCPA, pela amizade e respeito de anos de convivência.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas da Faculdade de Medicina-Universidade Federal do Rio Grande do Sul, diante da dedicação à ciência e da defesa da qualidade da formação acadêmica que assumem cotidianamente.

*- Esta pesquisa recebeu auxílio viabilizador do Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre - RS e da Fundação Médica do Rio Grande do Sul, Brasil -*

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>16</b>
2.1. ROSÁCEA.....	16
2.1.1. <i>Síntese histórica e conceituação vigente</i> .....	16
2.1.2. <i>Epidemiologia: prevalência e fatores de risco</i> .....	19
2.1.3. <i>Etiologia</i> .....	22
2.1.4. <i>Patogênese: compreensão geral e mediadores estudados</i> .....	24
2.1.5. <i>Diagnóstico: quadro clínico, classificação e histopatologia</i> .....	33
2.1.6. <i>Diagnóstico diferencial</i> .....	41
2.1.7. <i>Conduta terapêutica</i> .....	43
2.1.8. <i>Prognóstico</i> .....	44
2.2. DERMA E MATRIZ EXTRACELULAR .....	46
2.3. METALOPROTEINASES DA MATRIZ .....	48
2.4. IMUNOISTOQUÍMICA .....	66
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>70</b>
3.1. OBJETIVO PRINCIPAL .....	70
3.2. OBJETIVOS SECUNDÁRIOS.....	70
<b>4. REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>71</b>
<b>5. ARTIGOS APRESENTADOS ÀS REVISTAS .....</b>	<b>94</b>
5.1. ARTIGO 1: IMMUNOHISTOCHEMICAL EXPRESSION OF MATRIX METALLOPROTEINASES-2 AND -9 IN ROSACEA: A CASE-CONTROL STUDY.....	94
5.2. VERSÃO EM PORTUGUÊS DO ARTIGO 1 .....	122
5.3. ARTIGO 2: <i>DEMODEX FOLLICULORUM</i> AND METALLOPROTEINASES-2 AND -9 EXPRESSION IN INFLAMMATORY ROSACEA.....	151

5.4. VERSÃO EM PORTUGUÊS DO ARTIGO 2 .....	171
--------------------------------------------	-----

**ANEXOS..... 192**

ANEXO A - FOTOGRAFIAS CLÍNICAS DE ROSÁCEA INFLAMATÓRIA .....	192
ANEXO B - QUESTIONÁRIO PADRÃO .....	195
ANEXO C - PROCOLO GERAL DE AVALIAÇÃO DAS LÂMINAS .....	197
ANEXO D - PROTOCOLO ESPECÍFICO DE CADA PACIENTE INTEGRANTE DO ESTUDO - ANÁLISE DA IMUNOISTOQUÍMICA PELOS AVALIADORES .....	198
ANEXO E – FOTOGRAFIAS DA HISTOPATOLOGIA DA ROSÁCEA (H – E) .....	199
ANEXO F - FOTOGRAFIAS DA IMUNOISTOQUÍMICA DA ROSÁCEA E CONTROLES .....	201
ANEXO G - TERMO DE CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO .....	209

## LISTA DE FIGURAS

### REVISÃO DA LITERATURA

<b>Figura 1</b> – Mecanismo fisiopatogênico da rosácea.....	27
<b>Figura 2</b> – Estrutura e componentes das metaloproteinases.....	50
<b>Figura 3</b> – Célula estimulada, elaboração e regulação das metaloproteinases.....	53

### ARTIGO 1

<b>Figure 1</b> - Expression of MMP-9 in control patient: 1+ and mild in keratinocytes...	118
<b>Figure 2</b> – Expression of MMP-9 in rosacea patient: 3+ and intense in keratinocytes. .....	119
<b>Figure 3</b> – Expression of MMP-2 in control patient: 3+ and intense in fibroblasts...	120
<b>Figure 4</b> – Expression of MMP-9 in rosacea patient: 2+ and moderate in histiocytes and adjacent area. ....	121

### VERSÃO EM PORTUGUÊS DO ARTIGO 1

<b>Figura 1</b> – Expressão da MMP-9 em paciente controle: 1+ e fraca em queratinócitos. .....	147
<b>Figura 2</b> - Expressão da MMP-9 em paciente controle: 3+ e intensa em queratinócitos.....	148
<b>Figura 3</b> – Expressão da MMP-2 em paciente controle: 3+ e intenso em fibroblastos. .....	149
<b>Figura 4</b> – Expressão da MMP-9 em paciente com rosácea: 2+ e moderada em histiócitos e área adjacente.....	150



## ANEXOS

<b>Figura A1</b> – Estágio II (Plewig e Kligman) ou Subtipo 2 ( <i>National Rosacea Society</i> ). .....	192
<b>Figura A2</b> – Estágio II com variante fima (Plewig e Kligman) ou Subtipos 2 e 3 associados ( <i>National Rosacea Society</i> ). .....	193
<b>Figura A3</b> – Variante granulomatosa (Plewig e Kligman, <i>National Rosacea Society</i> ). .....	194
<b>Figura E1</b> – Neovascularização, dilatação vascular e processo inflamatório dérmico. .....	199
<b>Figura E2</b> – <i>Demodex folliculorum</i> e processo inflamatório adjacente. ....	200
<b>Figura F1</b> – Expressão da MMP-9 em paciente controle: 1+ e fraca em queratinócitos. .....	201
<b>Figura F2</b> – Expressão da MMP-2 em paciente controle: 2+ e moderada em queratinócitos. .....	202
<b>Figura F3</b> – Expressão da MMP-9 em paciente com rosácea: 3+ e intensa em queratinócitos. .....	203
<b>Figura F4</b> – Expressão da MMP-2 em paciente controle: 3+ e moderada em queratinócitos e unidade pilar. ....	204
<b>Figura F5</b> – Expressão da MMP-9 em paciente com rosácea: 2+ e moderada em queratinócitos. .....	205
<b>Figura F6</b> – Expressão da MMP-9 em paciente com rosácea: 1+ e fraca em endotélio; 1+ e fraca em matriz. .....	206
<b>Figura F7</b> – Expressão da MMP-2 em paciente controle: 3+ e intenso em fibroblastos. .....	207
<b>Figura F8</b> – Expressão da MMP-9 em paciente com rosácea: 2+ e moderada em histiócitos e área adjacente. .....	208

## LISTA DE TABELAS

### ARTIGO 1

<b>Table 1</b> – Semi-quantitative e qualitative analysis of MMP-2 in cases and controls. .....	116
<b>Table 2</b> – Semi-quantitative e qualitative analysis of MMP-9 in cases and controls. .....	117

### VERSÃO EM PORTUGUÊS DO ARTIGO 1

<b>Tabela 1</b> – Análise semi-quantitativa e qualitativa da MMP-2 em casos e controles. .....	145
<b>Tabela 2</b> – Análise semi-quantitativa e qualitativa da MMP-9 em casos e controles. .....	146

### ARTIGO 2

<b>Table 1</b> – General characteristics of patients with inflammatory rosacea.....	169
<b>Table 2</b> – Expression of MMP-9 in the fibroblasts of patients with inflammatory rosacea and the presence of <i>Demodex folliculorum</i> .....	170

### VERSÃO EM PORTUGUÊS DO ARTIGO 2

<b>Tabela 1</b> – Características gerais dos pacientes com rosácea inflamatória.....	190
<b>Tabela 2</b> – Expressão da MMP-9 nos fibroblastos na rosácea inflamatória e a presença do <i>Demodex folliculorum</i> .....	191

## LISTA DE ABREVIATURAS

Ac - anticorpos

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

CD4 – *Cluster of Designation 4*

DAB – diaminobenzidina (*diaminobenzidine*)

*Df* – *Demodex folliculorum*

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

FCE – fator de crescimento epidérmico

FNT – fator de necrose tumoral

Gy - *gray*

HCPA - Hospital de Clínicas de Porto Alegre

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

H-E – hematoxilina e eosina

IFD – imunofluorescência direta

IQ – imunoistoquímica

Ig – imunoglobulinas (*immunoglobulins*)

IgA – imunoglobulina A (*immunoglobulin A*)

IgD – imunoglobulina D (*immunoglobulin D*)

IgE – imunoglobulina E (*immunoglobulin E*)

IgG – imunoglobulina G (*immunoglobulin G*)

IgM - imunoglobulina M (*immunoglobulin M*)

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

kDa – quilodáton (*kilodalton*)

mm – milímetros (*millimetre*)

μm – micrômetros (*micrometer*)

MMPs – metaloproteinases da matriz (*matrix metalloproteinases*)

MMP-2 – metaloproteinase da matriz-2 (*matrix metalloproteinase-2*)

MMP-9 – metaloproteinase da matriz-9 (*matrix metalloproteinase-9*)

MW – Mann-Whitney

NRS – *National Rosacea Society*

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

RJ – Rio de Janeiro

RNA- ácido ribonucleico (*ribonucleic acid*)

mRNA – ácido ribonucléico mensageiro (*messenger ribonucleic acid*)

RS – Rio Grande do Sul

SP – substância P

TIMPs – inibidores teciduais das metaloproteinases (*tissue inhibitors of metalloproteinases*)

TIMP-1 – inibidor tecidual 1 das metaloproteinases (*tissue inhibitor of metalloproteinase-1*)

TIMP-2 – inibidor tecidual 2 das metaloproteinases (*tissue inhibitor of metalloproteinase-2*)

UFRGS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

UVA – ultravioleta A (*ultraviolet A*)

UVB – ultravioleta B (*ultraviolet B*)

## 1. INTRODUÇÃO

A rosácea é reconhecida como uma dermatose com fases clínicas distintas, de evolução imprevisível e com características etiopatogênicas não completamente definidas.(1,2)

A base da patogênese da rosácea é atribuída a um componente vascular e a um componente inflamatório. Porém, devido às evidências das conseqüências fundamentais que acarreta ao tecido dérmico, a desestruturação do seu tecido conjuntivo (denominado de matriz extracelular), também deve ser incluída como outro componente essencial de um tripé patogênico na rosácea.(2,3)

Certamente, cada componente desse tripé possui desdobramentos prévios que envolvem etapas próprias, praticamente apenas defendidas sob presunção teórica, já que, cientificamente, pouca comprovação existe. A seqüência cronológica destes processos ainda não foi estabelecida e, muito provavelmente, ocorrem sobreposições temporárias durante a evolução da doença.(4,5)

Frente à dificuldade de organizar-se uma teoria consensual acerca do processo patogênico, que justificaria o desenvolvimento da rosácea cutânea, é somada uma relativa inexistência de uma sólida gama de estudos capazes de avaliar quais os possíveis mediadores bioquímicos que agiriam nas distintas etapas patogênicas, com a conseqüente tradução clínica dos fenômenos que ocorrem no derma dos pacientes.

É reconhecido que, dentre esses mediadores, as enzimas endopeptidases denominadas metaloproteinases da matriz (MMPs) possuem importância para o remodelamento constante do derma, sítio do desenvolvimento da rosácea. Suas atividades histopatogênicas são muito abrangentes, envolvendo a degradação de

colágeno, o estímulo à angiogênese e a ativação de processos inflamatórios, como exemplos.(6,7,8)

As complexas inter-relações dessas endopeptidases com vários mediadores fisiológicos e patogênicos e com componentes celulares e intersticiais do derma, as têm tornado foco de investigações em muitas doenças dermatológicas.(9,10,11)

O presente estudo tem o objetivo de avaliar a presença de duas metaloproteinases na pele de pacientes com rosácea: a metaloproteinase-2 da matriz (MMP-2) e a metaloproteinase-9 da matriz (MMP-9), também denominadas, respectivamente, gelatinase A e gelatinase B, que são afins entre si como substratos antigênicos.(6-8)

Neste sentido, pretende-se verificar a possibilidade de serem incorporados conhecimentos novos para uma melhor compreensão da patogênese desta freqüente e importante doença cutâneo-oftálmica.(2,4,12)

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

A presente revisão da literatura está subdividida em quatro áreas que são complementares entre si e essenciais para a compreensão do que se pretende estudar: Rosácea, Derma e Matriz Extracelular, Metaloproteinases da Matriz e Imunoistoquímica.

### 2.1. Rosácea

#### 2.1.1. Síntese histórica e conceituação vigente

“Uma desordem que cedo na sua evolução manifesta-se por episódios de eritema e vasodilatação”; assim Beerman definiu a rosácea em meados do século XX. Tal “desordem” seria, na realidade, o resultado topográfico e morfológico de uma série de alterações pouco compreendidas. O autor apostava no termo “complexo da rosácea” para melhor tentar explicar o seu quadro etiopatogênico e sintomatológico.(13)

As características clínicas dessa dermatose são responsáveis por sua construção etimológica. Rosácea, em latim, significa “semelhante às rosas”.(14) Outras denominações históricas, com significados variados de acordo com o aspecto clínico enfatizado e a origem dos autores, foram: *gutta rosea*, *cupa rosa* e *bacchi*, em italiano; *goutte-rose*, *coupe-rose*, *pustule de vin*, em francês; *rooze-drup* e *wijnpuisten*, em holandês; e *Küpfergesicht*, *Küpferrinne*, *Weinblättern* e *roth Tropf*, em alemão.(14)

São encontradas referências aos indivíduos portadores de rosácea em variados tipos de manifestações artístico-populares entre os séculos XIV e XVI, como personagens caricatos na elaboração literária e teatral dos autores Chaucer, Shakespeare e Muret, por exemplo.(15)

Geralmente, tais personagens eram descritos como homens corpulentos, com grandes e vermelhos narizes, glutões de comidas apimentadas e salgadas e abusadores na ingestão de bebidas alcoólicas.(15)

Previamente, Galeno havia incluído a rosácea como uma dermatose conseqüente ao temperamento sangüíneo, um dos quatro tipos de humor (melancólico, colérico, fleugmático e sangüíneo).(16)

Entretanto, segundo Bersaques, a rosácea é uma doença cutânea que possui seu reconhecimento médico a partir o século XIV. Teriam sido dois médicos árabes, Rhazes e Avicenna, os introdutores do tema nas universidades européias (italianas, primeiramente). Porém, é possível que Paré, famoso barbeiro e cirurgião francês do século XIV, detenha a primazia original da descrição clínica da rosácea e do tratamento da afecção.(14)

Em livro médico de 1886, a rosácea estava incluída na “classe IV” das doenças da pele (“Inflamações e Exsudações”), que estavam distribuídas em sete classes.(17) O texto sobre rosácea está assim escrito por Courier, com as principais características clínicas e opções de terapêuticas:

*“Rosaceous Acne (red-nose) is the name given when there is no yellow matter, and there are lumps on the red skin of the nose and neighboring parts which often show red lines. Common causes of red faces are irregular habits, alcoholic drinking, and exposure to the weather, and it is most common in those who have all three of these causes present. It can be present when there is only dyspepsia, or no apparent cause to explain it. Rarely, the nose enlarges, and may become immense by the slow production of fibrous tissue. This is a chronic trouble, and is nearly as*



*much on one side of the face as on the other, and does not have scales, crusts, sores, or scars. Hence it is easily known.*

*Treat it by attending to internal disease if such be present. Liquor, wine and beer are to be avoided. Externally, prescription no 27 may be used, but is very slow if the disease be marked, when scratching with yhe point of a sharp knife helps very much, even when the parts are much changed. The knife, reaching into the skin deeply enough to draw blood freely, crossing cuts 1/10 of an inch apart are made. The blood should be allowed to flow freely. Hot water or pressure with lint will stop the flow of blood.”(17)*

Atualmente, o conceito abrangente da rosácea, sintetizado a partir de uma certa consensualidade da literatura, define esta como uma condição predominantemente cutânea, preferencialmente facial, multifásica, de evolução variável e com tendência à cronicidade, ocasionada por alterações de natureza vascular e inflamatória que agem sobre um arcabouço dérmico desestruturado.(12,18-22)

A rosácea pode ser classificada em estágios ou subtipos, dependendo da sistematização utilizada. De acordo com Plewig e Kligman, é possível classificar a dermatose em pré-rosácea ou diátese rosácea (*flushings* episódicos), estágio I (eritema congestivo e telangiectasias), estágio II (inflamatória ou papulopustular), estágio III (nódulos inflamatórios, infiltrações furunculóides e hiperplasia tecidual) e/ou em formas especiais (variantes): rosácea oftálmica (ocular), conglobata, *fulminans*, halogênica, esteróide, infecciosa ou “gram-negativa” (por Gram-negativos), edema persistente da rosácea e fimas (rinofima, gnatofima, metofima, otofima, e blefarofima).(2) Essa forma especial caracteriza-se, principalmente, por hiperplasia e hipertrofia glandular sebácea (ocasionando espessamento lobular da pele).(2)

A rosácea também é classificada de acordo com a recente padronização da *National Rosacea Society (NRS)* dos Estados Unidos da América em subtipos que podem estar associados entre si: subtipo 1 (eritemato-telangiectásica, com ou sem a presença do edema centro-facial), subtipo 2 (papulopustular), subtipo 3 (fimatosa), subtipo 4 (ocular) e variante (granulomatosa).(22)

Ambas as classificações estão detalhadas entre as páginas 36 e 42 deste trabalho.

### **2.1.2. Epidemiologia: prevalência e fatores de risco**

#### Prevalência geral na população

A prevalência pode variar entre 0,8% até 10% da população geral.(23,24) A variabilidade de freqüências encontradas deve-se a dois aspectos básicos: a composição étnico-racial da população estudada e o critério de inclusão para o diagnóstico da rosácea (enquanto alguns autores incluem o estágio inicial de eritema transitório, outros preferem incluir apenas os casos com alterações cutâneas e/ou oftálmicas permanentes).(23,24)

#### Fatores de risco

**a) Idade:** o diagnóstico ocorre predominantemente, entre os 30 e 60 anos, com ápice de prevalência entre os 40 e 50 anos; porém, devido à sua cronicidade, a faixa etária do primeiro diagnóstico pode ser mais elevada.(2,20,21,25) Apesar desse predomínio etário, a doença pode ocorrer na infância tardia, na adolescência e em idades mais avançadas.(18,24)

**b) Sexo:** ela acomete, principalmente, o sexo feminino, na proporção de três mulheres para um homem. Porém, o sexo masculino possui o predomínio quanto à presença dos fimas e dos quadros clínicos mais graves.(21-26)

**c) Predisposição genética:** apesar da falta de um marcador gênico específico (como os do sistema HLA – *human leukocyte antigens*), há evidências de uma predisposição genética à rosácea. Assim, entre 30%-40% dos pacientes possuem história familiar para rosácea e a ancestralidade escandinava aumenta o risco em até três vezes para o seu desenvolvimento.(2,5,18,19,24,27) Outro dado que sugere a influência genética no desenvolvimento da rosácea é o reconhecimento que a metaloproteinase-9 é uma enzima presente em concentrações superiores em pacientes com rosácea ocular quando comparadas aos controles. A expressão dessa enzima é controlada por um gene específico.(29)

**d) Fototipo cutâneo:** a ancestralidade escandinava, citada anteriormente, talvez se constitua em um fator de risco pela transmissibilidade das características que compõem o fototipo cutâneo (definido pela cor da pele, cabelos e olhos) e, conseqüentemente, quanto ao grau de sensibilidade às radiações ultravioletas.(30) A rosácea é rara em indivíduos da raça negra (apenas 9% dos pacientes com rosácea são negros) e freqüente em indivíduos de pele clara, com cabelos e olhos claros (ao se adotar a classificação de Fitzpatrick para fototipos cutâneos, seriam os indivíduos com fototipo I, II e III). Em populações escandinavas, até 10% dos indivíduos são acometidos pela dermatose. (2,18,19,24,27,30)

**e) Susceptibilidade ao *blushing* e história de acne na adolescência:** mesmo antes da segunda década de vida, alguns jovens e adolescentes possuem uma tendência à vasodilatação cutânea e ao avermelhamento súbito da face e,

eventualmente, da região cervical e do tórax anterior, devido a estímulos psicológicos (“*blushing*” ou eritema pudico, tradução clínica de uma “ruborização por emoção”), como os sentimentos de vergonha, constrangimento e raiva. São particularmente propensos ao desenvolvimento da rosácea os indivíduos, jovens ou não, com essa susceptibilidade. Jovens com acne e episódios de ruborização por emoção parecem ser mais suscetíveis à rosácea ao tornarem-se mais velhos.(2,19)

**f) Susceptibilidade ao *flushing*:** os pacientes que desenvolvem episódios repetidos de *flushing* possuem maior chance de desenvolver rosácea. O “*flushing*” (ou “ruborização”) pode ser definido como o eritema transitório em qualquer área do tegumento cutâneo, principalmente na face, região cervical, tórax superior e região epigástrica, provocado por diversos tipos de estímulos (nominados de fatores provocativos). Esses estímulos agem diretamente na musculatura lisa e/ou em receptores neurais centrais ou periféricos e que, portanto, podem ocasionar sintomatologia sistêmica simultaneamente (como hipotensão).(4,19,31)

**g) Condições socioeconômicas:** Marks apresenta a rosácea como uma dermatose que tende a ser mais comumente encontrada em grupos com baixas condições socioeconômicas.(19) Em nosso meio, através de um estudo com uma amostra populacional ambulatorial do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (Brasil), esse dado não foi confirmado. Ao contrário, existiu uma tendência das condições socioeconômicas elevadas constituírem risco para o desenvolvimento da rosácea.(25)

### **2.1.3. Etiologia**

A rosácea emerge da interação entre os dois fatores intrínsecos (ou constitucionais) com um ou mais fatores provocativos ambientais (ou comportamentais):

#### Fatores intrínsecos ou constitucionais

Os fatores são 1) a predisposição genética individual (possivelmente regulada por estruturas gênicas ou por antígenos leucocitários ainda não definidos), compreendida fenotipicamente a partir do fototipo cutâneo ou, mais provavelmente, da susceptibilidade às radiações ultravioletas (já que pode não ocorrer uma correlação exata entre as informações que são necessárias para compor a definição de um fototipo e o desenvolvimento do eritema após exposição aos raios ultravioleta) e 2) a capacidade reacional aumentada da vasculatura cutânea a estímulos variados internos ou externos ao organismo.(4,5,21,32)

#### Fatores ambientais ou comportamentais

São compreendidos como elementos internos ou externos ao organismo que, ao longo de um período variável, mas geralmente extenso, agem isoladamente, ou em conjunto, através de variados tipos de processos patogênicos.(4,21)

Uma vez instalada a doença, poderá haver agravamento do quadro a partir da ação de outros fatores ambientais, além da possível ação continuada dos fatores provocativos iniciais.(18,20) Para cada portador de rosácea, haverá um conjunto específico de fatores ambientais ou comportamentais importantes no desencadeamento (provocativos) e no agravamento (agravantes) da doença.(18)

Definem-se como fatores provocativos aqueles com a propriedade de agir no desenvolvimento da rosácea por, no mínimo, um dos cinco seguintes caminhos que estão inseridos no tripé patogênico “dano dérmico extracelular; vasculopatia e processo inflamatório”: alterações do arcabouço estrutural do derma com remodelamento da matriz; liberação de substâncias pró-inflamatórias; indução de episódios de vasodilatação súbita em pacientes predispostos; dano direto ao capilares e angiogênese.(2,4,5,12,33-36)

São conhecidos como fatores provocativos: **a)** exposição solar crônica ou aguda recorrente;(12,26,34) **b)** exposição a alimentos com alta temperatura;(35,36) **c)** exposição a variações climáticas abruptas (calor, frio, vento);(12) **d)** uso de bebidas alcoólicas e alimentos capazes de induzir vasodilatação;(35,36) **e)** uso de drogas vasodilatadoras, como isossorbida;(35) **f)** uso de drogas fotossensibilizantes e/ou condições clínicas fotossensibilizantes (como exemplos, respectivamente, diuréticos à base de hidroclorotiazida e infecção por vírus da imunodeficiência humana);(37,38) **g)** situações clínicas liberadoras de substâncias que provocam *flushing* (como exemplos, a síndrome carcinóide e das neoplasias endócrinas múltiplas);(39,40) **h)** alterações hormonais fisiológicas da fase do climatério;(4) **i)** processos infecciosos (a infecção por *Helicobacter pylori*, por exemplo);(41,42) **j)** distúrbios gastrointestinais relacionadas à gastrite, principalmente do antro;(43) **k)** disfunções hormonais indutoras da ação de citocinas e outros mediadores (como exemplos, a interleucina-8 e determinados neuropeptídeos)(12,35,41,44,45) e **l)** um conjunto de alterações emocionais.(4,25,46)

O *Demodex folliculorum* (*Df*) pode ser definido como um fator agravante da rosácea, sendo que o uso de alguns tipos de substâncias tópicas (como loções e cremes com cosméticos e/ou corticoesteróides) ou a presença de circunstâncias clínico-farmacológicas imunodepressoras podem favorecer a multiplicação desse ácaro comensal do aparelho pilossebáceo, tornando-o um agente secundário

relevante em determinados quadros de rosácea, em função do extenso processo inflamatório que pode induzir.(47,48) Mais recentemente, estudos publicados demonstram que a presença do *Df* no derma de pacientes com rosácea pode variar entre 44% e 90%, diferindo significativamente quando comparada aos indivíduos controles.(49,50) Além desse agente, os próprios fatores provocativos podem ser classificados como agravantes após a configuração do quadro de rosácea.(3-5)

#### **2.1.4. Patogênese: compreensão geral e mediadores estudados**

##### Compreensão geral da patogênese

Independentemente da(s) causa(s), a rosácea deve ser compreendida como uma doença dérmica de complexa patogênese.(12,13,19,34)

Ocorrem alterações temporárias e definitivas de componentes do tecido conjuntivo, desencadeamento de processos inflamatórios repetidos e vasculopatia por episódios de *flushings*, alterações endoteliais e neoformação vascular, resultando em vasos ectásicos (telangiectasias).(2,4,12,18,19,51)

A teoria com maior base científica na literatura defende que o componente principal na formação do processo patogênico da rosácea é, provavelmente, a anormal reatividade vascular cutânea, determinada por alterações do centro térmico regulador localizado no hipotálamo anterior e/ou pela diminuição do limiar contrátil da circulação cutânea facial a estímulos variados, que agem sem a participação de mecanismos centrais.(4,28,51-54)

Essa reatividade vascular anormal, determinada central ou localmente, traduz-se, clinicamente, pelo *flushing* ou “ruborização”.(36,55,56)

Segundo Wilkin, para o adequado estudo do fluxo sangüíneo cutâneo facial (e do *flushing*) deve ser utilizado um modelo matemático denominado “índice da

variação térmica da circulação malar”, o qual resulta da relação entre a temperatura malar da pele, realizada por teletermômetros, e o índice do fluxo cutâneo na face, realizado pelo sistema *laser* Doppler.(56)

Na maioria dos casos de rosácea, os episódios de vasodilatação ocorrem sobre um arcabouço tecidual de sustentação do derma que já possui algum grau de desestruturação provocado pelos efeitos da radiação ultravioleta na pele, principalmente as do fototipo I de Fitzpatrick (alteração de colágeno e fibras elásticas).(4,28,51-53)

A vasodilatação freqüente em uma pele comprometida em sua integridade tecidual de sustentação ocasiona extravasamento e acúmulo de líquido extracelular, o qual não consegue ser adequadamente removido pelo sistema de drenagem linfática.(4,18,19)

Essa insuficiência linfática pode ser aguda, resultado do acúmulo de quantidades expressivas de líquido, ou crônica, ocasionada por dano actínico direto sobre a rede de elastina que envolve os linfáticos (a rede de elastina íntegra fornece um caminho de baixa resistência para a passagem de macromoléculas através de interstício e possibilita aos linfáticos a remoção destas macromoléculas, já que altera a tensão dos filamentos de sustentação dos mesmos) e pelos processos inflamatórios subentrantes, pois enzimas liberadas nesses processos agem separando o citoesqueleto das membranas celulares linfáticas.(4,18,19)

A ação de neutrófilos (presentes no local pela quimiotaxia inflamatória) contribuiria, através de sua enzima elastase, para a falência linfática ao degradar o colágeno tipo IV, que ajuda a manter a integridade da parede capilar.(4,18,19)

O acúmulo continuado de líquido extracelular causado pela falência linfática provoca o desencadeamento de um processo inflamatório que pode tornar-se auto-sustentável, na medida em que ocorre exsudação e acúmulo de proteínas. Ao



resultado desse processo dá-se o nome de celulite dérmica estéril, que clinicamente revela-se por edema, eritema e pápulas.(4)

Esse acúmulo de proteínas plasmáticas, juntamente com o edema dérmico cronicado levam à fibroplasia e hipertrofia do tecido conjuntivo.(57)

Nessa etapa da patogênese, o fator XIIIa, uma transglutaminase componente do mecanismo de coagulação do sangue e que se concentra ao redor de vasos sangüíneos cutâneos superficiais, possui um papel importante, pois atua na reparação do tecido dérmico danificado, ocasionando fibroplasia, o que, a longo prazo, contribui para a formação dos achados clínicos dos fimas.(57)

As telangiectasias, evidenciadas clinicamente, são possivelmente ocasionadas pela redução da integridade mecânica do tecido conjuntivo (dano actínico e celulite dérmica) e pelos episódios repetidos de vasodilatação.(4)

Essa compreensão, sofreu substancial modificação a partir do trabalho de Neumann e Frithz, em 1998, que verificaram em cortes histopatológicos de rosácea um importante dano no endotélio capilar, com alterações que denominaram de regressivas (atrofia e separação celular), o que ocasionaria a formação de capilares com paredes finas, tornando-os dilatados e tortuosos.(12)

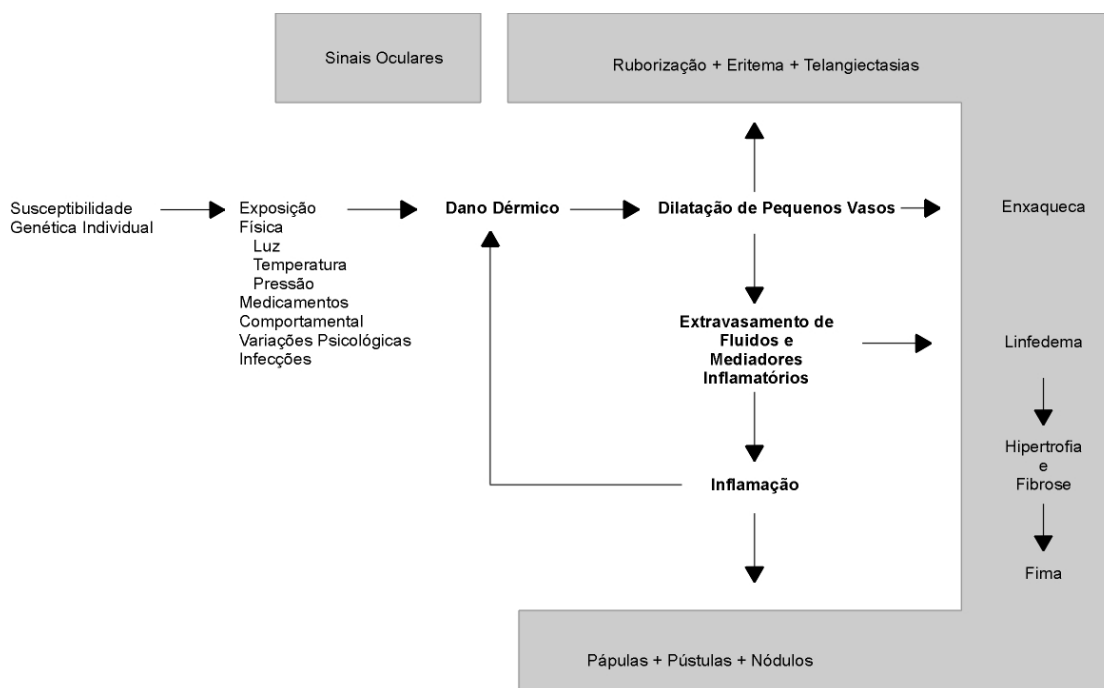
Tais alterações facilitariam a fusão entre as paredes de vários capilares dérmicos, gerando estruturas vasculares de maior diâmetro, verdadeiros microaneurismas. Para os autores, a rosácea é uma doença com uma patogênese primária centrada nos capilares, que sofreriam alterações ao longo dos anos devido à exposição a fatores externos e internos.(12)

A angiogênese, outro fenômeno sustentado como importante para a patogênese da rosácea, particularmente na variedade oftálmica da doença, pode ser induzida por outros mediadores, como o fator de crescimento de fibroblastos e a interleucina-8, que seriam liberados por proteases e macrófagos, respectivamente.(4,44,45)

O *Demodex folliculorum* (*Df*) provavelmente não participa dos eventos patogênicos que originam a rosácea, mas pode contribuir para o surgimento de quadros clínicos inflamatórios extensos na vigência de alterações cutâneas locais e/ou imunológicas que favoreçam a sua proliferação.(47,48)

Em um estudo histopatológico e imunoistoquímico do processo inflamatório em 10 pacientes com rosácea e *Df* associado, identificou-se intenso infiltrado inflamatório perifolicular com predomínio de células CD4+, além de um número aumentado de macrófagos e células de Langerhans. Os achados sugerem que ocorra uma reação de hipersensibilidade tardia (tipo IV) induzida por antígenos de origem folicular, provavelmente relacionados ao *Df*.(50)

De acordo com Bamford,(5) que publicou em 2001 uma proposta de modificação do esquema hipotético de fisiopatogenia sugerida por Marks,(2) a etiopatogenia da rosácea pode ser melhor compreendida se for assim visualizada:



**Figura 1** – Mecanismo fisiopatogênico da rosácea.

Realizada uma análise geral da literatura vigente, é possível afirmar que há espaços teóricos a serem preenchidos quanto à compreensão de quais os mediadores que realmente estariam implicados nos processos patogênicos descritos acima.

#### Os mediadores patogênicos estudados

De La Faille & De La Faille-Kuyper, em 1969, através da imunofluorescência direta (IFD), demonstraram a presença de imunoglobulinas (principalmente a imunoglobulina G - IgG) na junção dermo-epidérmica nas lesões de 21 pacientes entre 30, todos diagnosticados como portadores de rosácea. Em 10 pacientes também a pele normal possuía esses depósitos de imunoglobulinas. Os autores não obtiveram resultados positivos para a detecção de anticorpos séricos específicos e concluíram que os achados da IFD eram semelhantes aos encontrados nos pacientes com lúpus eritematoso. Tal contexto corresponderia a determinados casos de sobreposição dos achados clínicos entre as duas doenças.(58)

Em seguida, em 1970, Salo publicou um trabalho sobre a imunofluorescência direta em pacientes portadores de rosácea e demonstrou a existência de depósitos de imunoglobulinas IgG, IgM, IgA na junção dermo-epidérmica.(59)

Já em 1974, o estudo de Abell *et al.* envolvendo a análise de 91 casos de dermatoses inflamatórias localizadas na face, não encontrou, à imunofluorescência direta, positividade para a “banda” ou “faixa” lúpica entre os 35 casos de rosácea. Ao contrário, 28 dos 32 casos de lúpus possuíam IFD positiva para o depósito de imunoglobulinas. Segundo os autores, faixas positivas à IFD muito fracas em casos de rosácea poderiam corresponder a uma compressão do tecido conjuntivo dérmico contra a zona juncional devido ao edema, o que é mais visualizado em áreas perifoliculares da rosácea papulo-pustular.(60)

Nunzi *et al.*, em 1980, estudaram 7 pacientes com rosácea papulo-pustular e com padrão granulomatoso à histopatologia, quanto à IFD. Foram verificadas positivities à IFD, na zona basal, em 4 pacientes, na área envolvida pela rosácea; em 5 pacientes, em área exposta ao sol não envolvida pela rosácea e em 1 paciente, em área não exposta ao sol e não envolvida pela rosácea. Esse estudo demonstrou que a exposição solar pode confundir a interpretação correta dos achados da IFD na rosácea.(61)

Em um outro estudo sobre as características imunológicas da rosácea, realizado por Mana *et al.*, foi encontrado, a partir de 25 casos de rosácea, 6 com IgM sérica elevada e 12 com depósitos de IgG e/ou IgM e/ou fração do complemento, à IFD das lesões.(62)

A interleucina-8 foi sugerida por Wilkins e por Szlachcic *et al.* como possivelmente um dos mediadores da rosácea, pelo seu potencial efeito angiogênico.(4,46)

Outras citocinas foram sugeridas com participantes da patogênese da rosácea, como a endoglina, que estimularia o crescimento de capilares e o fator de crescimento vascular endotelial.(5)

Foi demonstrado que a substância P (SP), no sangue periférico, está elevada em alguns pacientes com rosácea (9 de 23 pacientes). Kürkçüoğlu & Alaybeyi demonstraram a presença da substância P na derme das lesões de 3 pacientes com rosácea, através de método imunoistoquímico.(63,64)

Esse neuropeptídeo possuiria como funções: o aumento do fluxo sanguíneo por provocar vasodilatação reflexa neural e por induzir a liberação de potentes vasodilatadores, como a histamina e o fator ativador plaquetário; o estímulo à proliferação de fibroblastos; o aumento da proliferação epitelial e endotelial e a liberação de mediadores inflamatórios dos macrófagos e linfócitos T.(63-65)

Além dessas ações patogênicas, Powell *et al.* hipotetizaram sobre um possível papel da substância P na hipocloridria gástrica encontrada em determinados pacientes com rosácea, já que há um armazenamento da mesma em células enterocromafins da mucosa gástrica e é reconhecido o papel da SP na redução da acidez gástrica.(63)

Os fimas possivelmente possuem como mediadores o fator XIIIa (componente da casacata da coagulação, presente em células dendríticas e fibroblastos da derme e que age na hipertrofia e hiperplasia do tecido conjuntivo dérmico) e o peptídeo intestinal vasoativo (neuropeptídeo que participa da regulação da fluxo sangüíneo e de processos inflamatórios, além de estimular proliferação de queratinócitos), de acordo com trabalhos que utilizaram método imunistoquímico.(65-67)

O peptídeo intestinal vasoativo está localizado nas terminações neurais do derma e tais terminações peptidérgicas estão em número elevado na rosácea.(64)

Experimentalmente, há mediadores que foram estudados em relação à rosácea ocular, que podem ser úteis na compreensão da etiopatogenia geral da rosácea.

Em 1997, Barton *et al.* compararam no fluido lacrimal as concentrações da interleucina-1 alfa (IL-1), fator de necrose tumoral alfa (FNT) e fator de crescimento epidérmico (FCE), entre 14 pacientes com rosácea ocular, 12 pacientes controles pareados por idade e 15 indivíduos controles em condições consideradas normais para a função lacrimal.(68) Através do método de enzimaensaio (ELISA), foi verificado que a IL-1 estava em concentrações mais elevadas nos pacientes com rosácea ( $p= 0,003$ , quando comparada ao grupo pareado por idade e  $p< 0,001$ , quando comparada ao grupo de controles considerados funcionalmente normais); que o FNT não atingia níveis detectáveis em pacientes e controles e que as concentrações do FCE eram semelhantes entre os pacientes e controles. Os autores

também observaram uma correlação inversa entre as concentrações de IL-1 e a depuração lacrimal no grupo de pacientes com rosácea.(68)

Através do método de ELISA, em 1998, novamente Barton *et al.* demonstraram um aumento da IL-1 no fluido lacrimal em pacientes com rosácea, quando a comparação realizou-se com pacientes controles.(69) Esses autores, com os dois trabalhos, concluíram que a diminuição da depuração lacrimal dos pacientes com rosácea, contribuiria para a persistência de níveis elevados de IL-1 na lágrima dos pacientes.(68,69) Essa situação corresponderia a um mecanismo de retroalimentação positivo, já que as concentrações elevadas de IL-1 resultariam em maior dano inflamatório ocular e aumento da estagnação lacrimal.(68,69)

O trabalho de Afonso *et al.* envolveu 13 pacientes com rosácea ocular e 13 indivíduos sem doença oftalmológica. A depuração fluoresceínica da lágrima foi avaliada por fluorômetro e o material foi analisado pelo método de ELISA. Os pacientes com rosácea possuíam depuração lacrimal retardada ( $p < 0,001$ ), concentrações mais elevadas de IL-1 ( $p < 0,001$ ) e uma maior atividade de gelatinase B (metaloproteinase da matriz-9) ( $p < 0,001$ ). (70)

Também nesse estudo houve uma correlação entre o atraso da depuração e a elevada concentração de IL-1. Foi verificada, igualmente, a correlação entre o atraso da depuração e o aumento da atividade da gelatinase B, além de uma correlação entre a elevada concentração da IL-1 e o aumento atividade da gelatinase B.(70)

Sobrin *et al.*, através do método de ELISA, encontraram no fluido lacrimal maior concentração da metaloproteinase da matriz-9, em sua forma pró-ativa (com 92 kDa), nos 15 pacientes com rosácea, quando comparados com os 8 indivíduos controles ( $p = 0,006$ ). O inibidor tecidual das metaloproteinases tipo 1 (TIMP-1) também esteve em concentrações superiores nos casos de rosácea ( $p = 0,016$ ), demonstrando que a lágrima dos pacientes com rosácea possuía a forma

zimogênica da MMP-9 e o seu inibidor. Além disso, esse trabalho, através da zimografia, demonstrou a presença de MMP-9 ativa (com 82 kDa) nos pacientes com rosácea.(29)

A presença diferenciada de MMP-9 ativa em pacientes com rosácea, descrita anteriormente por Afonso *et al.*, sugeriria um mecanismo alternativo de ativação, como por exemplo o aumento dos níveis de elastase e da metaloproteinase-3. Tais enzimas não seriam afetadas pelo inibidor TIMP-1, presente também no fluido lacrimal dos pacientes com rosácea ocular.(70)

Em 2000, Kiratli e Orhan descreveram 8 pacientes portadores de rosácea ocular apresentando meibomite primária difusa crônica e 10 pacientes controles, quanto à presença de lactoferrina, que possui efeito antibacteriano e inibidor da cascata do complemento. As concentrações menores dessa glicoproteína eram vistas nos casos de rosácea, porém sem significância estatística.(71)

Outros mediadores da rosácea sugeridos são a gastrina e o ácido 5-hidroxiindolacético.(39,41,46) Provavelmente essas substâncias se constituem em fatores provocativos e/ou agravantes em determinadas situações clínicas, mas não são mediadores intrínsecos ao processo patogênico geral da rosácea.

Alguns mediadores citados nos trabalhos publicados na literatura advêm da pretensa associação da rosácea com a infecção pelo *Helicobacter pylori*. Por exemplo, a gastrina, assim como o fator de necrose tumoral alfa, a interleucina-8, a dismutase e o óxido nítrico, poderiam ser citados como mediadores possíveis de certos casos de rosácea associados ou não à infecção pelo *Helicobacter pylori*.(41,46,72,73) Essa associação, porém, não é completamente reconhecida por todos os estudiosos do tema, havendo controvérsias entre importantes pesquisadores.(41,42,73-76)

### 2.1.5. Diagnóstico: quadro clínico, classificação e histopatologia

#### Quadro Clínico

O quadro clínico clássico da rosácea possui os sinais cutâneos que se tornaram os critérios para a definição do seu diagnóstico: eritema persistente e telangiectasias (geralmente associados a um relato de episódios de ruborizações repetidos). As pápulas inflamatórias, com ou sem pústulas, e a ausência de comedões podem complementar o quadro.(1,19,20)

O avermelhamento abrupto, de duração variável, ocasionado pela vasodilatação, envolve a face, principalmente sua área convexa (área central da face, ou seja, regiões malar, frontal, mentoniana, nasal e da glabella), e, eventualmente, outras regiões do corpo, como os olhos (ocasionando conjuntivite, irite, iridociclite), a região peripalpebral (blefarite), o couro cabeludo, a região cervical, o tronco anterior, o epigástrico e as extremidades (quando as lesões localizam-se extrafacialmente, a rosácea é denominada disseminada). Raramente o paciente com esse quadro clínico também desenvolve repercussões sistêmicas em decorrência da vasodilatação, como hipotensão e tonturas.(2,54,77,78)

Geralmente, as suas queixas são localizadas, referindo-se à sensação de calor, ardência ou queimação, com ou sem um leve prurido, na face e regiões afetadas.(2) Relatos de cefaléia do tipo enxaquecosa e distúrbios visuais ocorrem e podem ser clinicamente importantes, mas é o desfiguramento facial, que ocasiona constrangimentos no plano psicossocial, o principal motivo da solicitação de ajuda ao médico.(2,34,54)

Lesões cutâneas granulomatosas podem ocorrer após longa evolução ou, raramente, após curto período evolutivo.(79) Os fimas são considerados por Plewig



e Kligman como uma variante da rosácea, podendo compor o quadro em qualquer estágio da doença, principalmente nos mais avançados.(2)

O desenvolvimento de doença abrupta e intensamente inflamatória, nodular, com aspecto denominado de pioderma facial, como primeira manifestação, sem prévias alterações vasculares, é raro, ocorrendo principalmente em mulheres após período de estresse psicológico.(80) Jugova e Semrádová descreveram 6 casos com essas características, observados entre 1992-1999. Todos eram femininos, com idades entre 23 e 46 anos e associados a episódios prévios de acne e de alterações do estado emocional.(81)

### Classificação

#### *Em Estágios*

De acordo com Greaves, a classificação segundo a progressão clínica da rosácea pode ser descrita em uma fase inicial (episódios de *flushing*, discretas telangiectasias e edema transitório), uma fase progressiva (pápulas, pústulas, edema persistente, várias e proeminentes telangiectasias) e uma fase tardia (infiltração e rinofima).(1)

Porém, é de Plewig e Kligman a classificação clínica-evolutiva da rosácea com a maior difusão e reconhecimento na Dermatologia,(2) apresentada a seguir:

**Diátese rosácea**: também denominada de eritema episódico ou pré-rosácea, constitui um estágio anterior àqueles que cursam com as alterações permanentes. Ocorre reação eritematosa transitória do tipo *flushing* nas áreas centrais da face e, menos freqüentemente, nas regiões cervical e torácica anterior.

**Estágio I:** os achados já são considerados como os de rosácea. Nessa fase evolutiva, o eritema dura mais tempo (horas ou dias), constituindo-se no eritema congestivo. Surgem as telangiectasias, que se tornam progressivamente mais pronunciadas, principalmente no nariz, dobras nasolabiais, região malar e glabella.

**Estágio II:** aparecem as pápulas inflamatórias, com ou sem pústulas, em quantidades variáveis, que persistem por muitas semanas. As lesões envolvem o aparelho pilossebáceo e podem produzir cicatrizes, em sua maioria, superficiais. O dano actínico crônico é verificado pela *cutis rhomboidalis* e por comedões solares. Nesse estágio, são freqüentes as exacerbações da rosácea, que pode acometer toda a face, além do couro cabeludo, e, menos freqüentemente, as regiões retroauricular, pré-esternal e cervical. Nas palmas pode ocorrer eritema persistente.

**Estágio III:** é pequena a proporção de pacientes que evoluem para esse estágio, que é considerado o de maior gravidade clínica. Há lesões inflamatórias nodulares e furunculóides, eritema infiltrativo e hiperplasia sebácea. As localizações preferenciais são o nariz e a região malar. O contorno facial torna-se espessado e irregular. Com a evolução, toda a pele da face pode mostrar-se intensa e difusamente inflamada, edemaciada e espessada, com largas aberturas foliculares, o que fornece o aspecto conhecido como pele “em casca de laranja” (originalmente, *peau d’orange*). Com a progressão das alterações, podem ocorrer hipertrofia do tecido conjuntivo, fibrose e hiperplasia difusa de glândulas sebáceas. Com o grande crescimento de múltiplas glândulas sebáceas, formam-se numerosas pápulas amareladas e umbilicadas nas regiões malar, frontal, temporal e nasal. A infiltração e o espessamento das dobras e sulcos faciais podem formar um aspecto do tipo “*facies leonina*”, vista na Hanseníase e em processos linfomatosos.

**Formas Especiais (Variantes)**: são quadros clínicos que não se incluem na clássica apresentação da rosácea, ainda que façam parte de seu espectro clínico: - edema persistente: edema não depressível, encontrado principalmente nas regiões frontal, nasal e malar e na glabella; - rosácea oftálmica: em torno de 50 % dos pacientes desenvolvem no curso da doença alguma manifestação oftalmológica, incluindo blefarite (eritema e escamas nas pálpebras, sendo a manifestação mais comum), conjuntivite, irite, iridociclite, ceratite e erosão. Em 20% dos casos, a rosácea oftálmica precede as manifestações cutâneas e, em 27%, as alterações oculares e cutâneas são simultâneas. As complicações oftalmológicas independem da gravidade da rosácea, mas estão associadas com a facilidade do desencadeamento do *flushing*. A ceratite pode levar à opacidade corneana e à cegueira; - rosácea granulomatosa (lupóide): caracterizada por múltiplas pápulas ou pequenos nódulos eritemato-acastanhados ou alaranjados sobre eritema difuso, essa variante, também conhecida como tuberculides de Lewandowsky (atualmente reconhecida como dissociada da tuberculose) e como *lupus miliaris disseminatum faciei*, possui curso crônico e não remitente; - rosácea esteróide: o uso crônico de corticoesteróides tópicos na rosácea resulta em atrofia cutânea, formação de telangiectasias e escurecimento do eritema facial, além de produzir lesões papulopustulosas superficiais e profundas e nódulos endurecidos; - rosácea halogênica: a administração sistêmica de compostos iodados e de bromídeos pode acarretar o desenvolvimento de quadro clínico semelhante ao da rosácea conglobata; - rosácea gram-negativa: clinicamente semelhante aos estágios II e III, apresenta-se com múltiplas pústulas ou nódulos profundos. A cultura das lesões pode demonstrar bactérias como as do gênero *Klebsiella*, *Proteus*, *Escherichia*, *Pseudomonas* e *Acinetobacter*; - rosácea conglobata: manifesta-se por abscessos nodulares hemorrágicos e placas infiltradas em base acentuadamente eritematosa, possuindo curso crônico; - rosácea fulminans: mais freqüente em mulheres jovens, é

geralmente associada a traumas psicológicos. Reconhecida como “pioderma facial”, seu quadro caracteriza-se pelo predomínio de grandes nódulos que abruptamente espalham-se pela face, a qual está toda eritematosa. Os nódulos são acompanhados de drenagem de fístulas intercomunicantes. Quando ocorre a melhora, verificam-se os estigmas clássicos da rosácea. Ao contrário da rosácea conglobata, não há tendência à recorrência; - fimas: o termo significa inchaço, massa ou bulbo, em grego. Eles podem acompanhar qualquer estágio da rosácea (usualmente o estágio III) ou ser o único sinal evidente no momento do diagnóstico, e acometem predominantemente os homens. O fima mais comum é o do nariz: o rinofima. O nariz torna-se bulboso, bastante aumentado de tamanho, com orifícios foliculares dilatados, superfície cutânea nodular, às vezes tumoral, podendo formar aspecto assimétrico. Há telangiectasias e pode ocorrer algum eritema. Não raramente, observa-se drenagem de secreção sebácea composta por camada córnea, sebo, bactérias e, às vezes, *Demodex folliculorum*. Outros fimas, consideravelmente menos frequentes, são o gnatofima (do mento), o metofima (da frente), o otofima (do pavilhão auricular) e o blefarofima (das pálpebras).

#### *Em Subtipos*

Devido à falta de consenso quanto à presença de algumas variantes na classificação de rosácea e, portanto, devido à dificuldade de padronização do diagnóstico e da classificação entre os especialistas e dermatologistas em geral, em 2002 o Comitê de *Experts* da *National Rosacea Society*, publicou uma padronização conceitual sobre a rosácea, que envolveu as diretrizes para o seu diagnóstico e uma nova classificação, descrita em subtipos (ao invés de estágios).(22)

Para o Comitê, no diagnóstico da rosácea devem ser identificadas duas categorias de características clínicas: as primárias e as secundárias. O diagnóstico

seria realizado quando da presença de uma ou mais características primárias. As características secundárias podem acompanhar o quadro clínico. Entre as primárias estão o *flushing* (eritema transitório), o eritema não-transitório, pápulas e pústulas e as telangiectasias. Entre as características secundárias estão: os sintomas de ardência (ou queimação) e de picada, a formação de placas, a aparência de ressecamento cutâneo, o edema, as manifestações oculares e de localização periférica e as alterações fimatosas.(22)

Na classificação da rosácea, o Comitê definiu quatro subtipos e uma variante, sendo que cada subtipo inclui os sinais mínimos necessários para firmar o diagnóstico correspondente.(22) Além disso, os pacientes podem ter características de mais de um subtipo ao mesmo tempo. A classificação é a seguinte:

**Subtipo 1 (rosácea eritemato-telangiectásica):** caracterizada por ruborizações transitórias e eritema centro-facial persistente. As telangiectasias são comuns, porém não são essenciais para o diagnóstico. Edema centro-facial e o relato de sensação de ardência, picada, aspereza e escamações podem ocorrer. A história de *flushing* isolada é comum entre os pacientes com rosácea eritemato-telangiectásica.

**Subtipo 2 (rosácea papulo-pustular):** caracterizada por eritema centro-facial com pápulas ou pústulas (ou ambas) em distribuição centro-facial. Entretanto, pápulas e pústulas podem ocorrer periorificalmente (perioral, perinasal, periocular). Este subtipo pode lembrar acne vulgar, porém os comedões estão ausentes. Sensação de ardência e picada podem ocorrer. Este subtipo freqüentemente está associado ao subtipo 1, incluindo as telangiectasias, que podem ser obscurecidas pela presença do eritema, pápulas e pústulas, tornando-se visível com o tratamento destes componentes inflamatórios.

**Subtipo 3 (rosácea fimatosa):** este subtipo inclui pele espessada, nodularidades superficiais irregulares e alargamento tecidual. O rinofima é o mais comum, mas podem ocorrer fimas em outras áreas, além da nasal, como no mento, na fronte, na região malar e nas orelhas. Este subtipo pode ocorrer em combinação com os dois subtipos anteriores.

**Subtipo 4 (rosácea ocular):** esse diagnóstico deve ser considerado quando há um ou mais dos seguintes sinais ou sintomas: hiperemia conjuntival interpalpebral, sensação de corpo estranho, de ardência e de ressecamento, prurido, sensibilidade à luz, visão borrada, telangiectasia da conjuntiva e da borda palpebral e eritema periocular. Blefarite, conjuntivite e irregularidade das margens palpebrais também podem ocorrer. Infecção estafilocócica crônica (hordéolo) e calázio, apresentando-se como conseqüências da disfunção da glândula “meibomiana”, são sinais de oftalmopatias associadas à rosácea. Alguns pacientes podem evoluir com diminuição da acuidade visual devido às complicações corneanas (ceratite puntata, úlceras ou infiltrados corneanos, ceratite marginal). O tratamento da rosácea cutânea nem sempre é suficiente para diminuir os riscos da perda de visão ocasionada pela rosácea ocular. Apesar de, em geral, estar presente a sintomatologia cutânea, essa não é requisito essencial para o diagnóstico de rosácea ocular, sendo que, em aproximadamente 20% dos pacientes com rosácea ocular, os sinais oculares precedem os cutâneos. É uma minoria que desenvolve simultaneamente rosácea ocular e cutânea.

**Variantes (rosácea granulomatosa):** caracterizada por pápulas ou nódulos monomórficos, duros, alaranjados, amarronzados ou eritematosos, localizados preferencialmente em regiões malares e áreas periorificiais e que podem levar a

cicatrices. São lesões menos inflamatórias que as do subtipo 2, situando-se em base cutânea normal, na maioria das vezes. Não são necessários outros sinais de rosácea para o diagnóstico dessa variante.

**Exclusões:** devido à falta de evidências, as seguintes condições foram excluídas como rosácea ou variantes: rosácea *fulminans* (pioderma facial), erupção acneiforme induzida por esteróide e dermatite perioral.

### Histopatologia

Existe boa correlação entre os estágios clínicos ou subtipos da rosácea e a histopatologia(82) e, segundo Lever & Lever,(33) há três padrões histopatológicos na rosácea que, eventualmente, apresentam-se em conjunto: o tipo eritemato-telangiectásico (relacionado à rosácea vascular, com eritema, telangiectasia e, raramente, pústulas), o tipo papuloso (relacionado à rosácea inflamatória, com pápulas firmes e elevadas) e o tipo glandular hiperplástico (relacionado aos fimas).

De acordo com Rhodes *et al.*, não é possível a identificação da etiologia do *flushing* por meio da histopatologia cutânea.(83)

A elastose é um achado freqüente e encontra-se mais pronunciada à medida que se avança nos estágios clínicos da rosácea. Dilatações de vasos sangüíneos e linfáticos, edema e infiltrado inflamatório linfocítico perivascular esparso são encontrados principalmente no estágio I.(27) Processo inflamatório linfocitário e histiocitário mais intenso, de localização perivascular e perifolicular e coleções de neutrófilos intrafoliculares, além de dilatação de vasos, principalmente venosos, são as características da rosácea no seu estágio II. No estágio III e nos fimas, encontram-se, de forma mais pronunciada, a hipertrofia do tecido conjuntivo, a hiperplasia das glândulas sebáceas e a deformidade de canais foliculares.

Alterações decorrentes de processos inflamatórios antigos e uma grande quantidade de degeneração de tecido elástico são visualizados nesse estágio e variante.(27,66,67)

Quanto ao *Demodex folliculorum*, ele é encontrado em pequeno número no infundíbulo folicular e nos ductos sebáceos, podendo ocorrer em todos os estágios da rosácea. Histopatologicamente, sua participação é a de um comensal, mas ele pode tornar-se patogênico em alguns casos.(27,82,84)

Na rosácea granulomatosa ou lupóide, ocorre formação de granulomas epitelióides não-caseosos, com células gigantes multinucleadas em grande quantidade. Já na rosácea *fulminans*, observam-se abscessos, hiperplasia pseudoepiteliomatosa, necrose e coleções de neutrófilos.(27,79)

Quanto às técnicas complementares em histopatologia, segundo Plewig e Jansen,(85) a imunoistoquímica e imunofluorescência não auxiliam na identificação da rosácea, apesar de alguns estudos demonstrarem depósitos de imunoglobulinas e complemento na junção dermo-epidérmica (semelhante aos depósitos observados no lúpus eritematoso).(58,59) Estes depósitos provavelmente seriam provocados pela exposição às radiações ultravioleta e/ou por processos inflamatórios.(2,61)

#### **2.1.6. Diagnóstico diferencial**

A rosácea pode ser confundida com outras doenças dermatológicas, principalmente as que afetam a face e possuem componente marcadamente eritematoso e/ou papuloso.

Dentre essas principais afecções, seja pela prevalência ou pelo grau de morbidade que provoca, está o lúpus eritematoso.(58-61) O eritema malar do lúpus sistêmico, as pápulas e placas inflamatórias do lúpus subagudo e, mais raramente,



as lesões iniciais de lúpus crônico discóide, podem ser de difícil diferenciação com determinados casos de rosácea.(1,85)

A histopatologia pode auxiliar na maioria das dúvidas, porém alguns pacientes permanecem sem diagnóstico conclusivo, mesmo após a análise histopatológica e a imunofluorescência direta. Isso é devido à característica do lúpus eritematoso em ocasionar ectasia vascular e infiltrado inflamatório perivascular e anexial, e eventualmente, levar a dano epidérmico muito discreto.(86) Por outro lado, a imunofluorescência direta da pele na rosácea pode apresentar depósitos de IgM, IgG, IgA e componentes do complemento na junção dermo-epidérmica; achados descritos similarmente no lúpus eritematoso (na denominada “faixa lúpica”).(59,87)

Outras doenças dermatológicas que clinicamente e, eventualmente, histopatologicamente, podem ser confundidas com a rosácea são: a acne, a dermatite perioral, a dermatite seborréica, a demodicidose, a erupção por fotossensibilidade, a erupção polimorfa solar, o reticulóide actínico, a dermatomiosite, a sarcoidose, os infiltrados linfocíticos do tipo pseudolinfoma e determinados casos de erisipela facial.(1,2,84-88)

Em um terceiro grupo de importância no diagnóstico diferencial se pode incluir as dermatites de contato, o lúpus vulgar (tuberculose), a síndrome de Haber, a síndrome carcinóide, o angiossarcoma de face, as alterações cutâneas pelo uso crônico de corticoesteróide e determinados quadros clínicos de neoplasia endócrina múltipla, policitemia, de estenose mitral e de obstrução da veia cava superior.(1,2,39,85,88,89)

### 2.1.7. Conduta terapêutica

A conduta terapêutica na rosácea é compreendida por prevenção, tratamento da dermatose em atividade, manutenção para evitar recidivas (supressão) e correção de seqüelas estruturais.(1,2)

A prevenção é realizada evitando, sempre que possível, a exposição aos fatores provocativos e agravantes. Inserindo neste contexto, está a necessidade do uso dos filtros solares, para a proteção da pele contra as radiações ultravioleta A e B, e o adequado manejo das alterações de caráter emocional, que exige uma reforço do vínculo na relação médico-paciente e, eventualmente, o acompanhamento especializado paralelo.(1,2,90)

No tratamento da rosácea em atividade, é importante ressaltar a dificuldade no manejo das manifestações vasculares e edematosas. Apesar das possibilidades teóricas, os medicamentos usados não são específicos para a vasodilatação facial, ocasionando, em doses terapêuticas, efeitos indesejáveis com freqüência, tais como hipotensão e cefaléia. Além disso, não há ensaios clínicos embaixadores de seu uso rotineiro. Entre os medicamentos estão a clonidina, a rilmenidina e o ondansetron.(91-93)

A rosácea inflamatória (os estágios II e III e as suas variantes inflamatórias ou o subtipo 2, o edema centro-facial e a variante granulomatosa) possui amplas possibilidades no emprego medicamentoso para o seu controle. Entre as drogas mais utilizadas e que possuem graus variados de evidências na literatura quanto aos seus benefícios, estão a tetraciclina (via oral), a doxiciclina (via oral), a claritromicina (via oral), a ivermectina (via oral), a clindamicina (via tópica), o ácido azeláico (via tópica), a sulfacetamida com enxofre (via tópica), o permetrin (via tópica), a tretinoína (via tópica), a eritromicina (vias tópica e oral), e o metronidazol (vias tópica e oral).(2, 94-108)

A dapsona e a isotretinoína via oral são alternativas para quadros graves, resistentes e recalcitrantes de rosácea inflamatória, além de serem indicadas para a rosácea granulomatosa, sendo a isotretinoína possivelmente útil no tratamento dos fimas em suas fases iniciais.(2,109,110)

Na supressão da atividade inflamatória, há evidência na literatura que o uso de metronidazol tópico mantém por mais longo prazo (por no mínimo 6 meses) a rosácea sob controle.(111)

Quanto ao tratamento dos aspectos não estéticos, são as telangiectasias e os fimas os principais alvos de tratamento, podendo ser empregados, principalmente, a eletrocoagulação, a crioterapia e o *laser* (à luz pulsada, principalmente) para as alterações vasculares e a dermoabrasão, a decorticação cirúrgica e o *laser* (de argônio, à luz pulsada ou de dióxido de carbono) para as hiperplasias glandulares e hipertrofias do tecido conjuntivo.(2, 112-115)

Segundo Wolf, a chave para o controle da atividade da rosácea está na combinação das medidas não-farmacológicas preventivas com a escolha correta do esquema medicamentoso. O paciente deve compreender a importância de todas as medidas e estar motivado para aderir a proposição médica.(116)

### **2.1.8. Prognóstico**

A rosácea é uma doença cutânea de prolongada duração, que possui períodos de exacerbação e acalmia, podendo envolver espontaneamente entre 1 e 2 anos do seu início ou, mais freqüentemente, permanecer por muitos anos.(19,20,25)

De acordo com um estudo sobre o perfil epidemiológico da rosácea com 62 pacientes, em Porto Alegre (Brasil), Bonamigo *et al.* encontraram uma média de duração da dermatose de 5,2 anos.(25) Porém, 10 anos antes, Irvine & Marks

publicaram estudo semelhante com 35 pacientes, apontando a média de duração da rosácea de 13 anos. De acordo com esses autores, o edema facial e as manifestações oftalmológicas (ceratite e conjuntivite), no momento do diagnóstico, possivelmente constituam elementos indicadores de evolução protraída da rosácea.(117)

Além da alta possibilidade da persistência do eritema e das telangiectasias, sem que haja outros sinais de atividade da doença, a involução do quadro inflamatório agudo não costuma ocasionar seqüelas, exceto na variante oftálmica e nas variantes com comportamento dérmico profundo (rosácea granulomatosa, conglobata e Gram-negativa, pela classificação de Plewig e Kligman).(2)

Particularmente importantes são as seqüelas oftálmicas. A erosão epitelial corneana recorrente e a ulceração estromal corneana estéril relacionadas à rosácea podem ocasionar diminuição da acuidade visual e, a longo prazo, cegueira.(3,29)

No Chile, Alvarez *et al.* revisaram as principais causas de rejeição ao transplante de córnea e, entre as três primeiras, encontraram a ceratite por rosácea.(118)

Outrossim, é principalmente na área psico-social e ocupacional que a rosácea possui as suas conseqüências mais referidas pelos pacientes e observadas por médicos e pela sociedade em geral.(90)

Nos Estados Unidos da América é estimado que aproximadamente 13 milhões de pessoas sejam portadoras de rosácea. De acordo com uma pesquisa realizada pela *National Rosacea Society*, 75% dos pacientes possuem baixa auto-estima, 60% referem que a dermatose afeta negativamente suas atividades profissionais e 57% crêem que suas atividades sociais são abaladas pela rosácea.(3)

Além disso, muitos pacientes sofrem pelo estigma do eritema facial estar relacionado ao consumo de álcool (mesmo que não ingiram bebidas alcoólicas e que

o álcool por si só não seja uma causa isolada da doença, mas um fator que acentua o eritema).(3)

## **2.2. Derma e Matriz Extracelular**

O derma é a porção da pele resistente e elástica que está localizada de forma intermediária, entre o epiderma e o hipoderma (tecido gorduroso subcutâneo). Ele possui espessura que varia entre 1-5mm e pode corresponder a até 20% do peso corporal humano. Entre as suas principais funções está a de fornecer suprimento nutricional ao epiderma e apêndices cutâneos, além de servir para amortecer os impactos externos, possuir ação de termorregulação e de sensopercepção.(88,119,120)

A base do derma é uma matriz de suporte na qual polissacarídeos e proteínas coexistem e interagem para produzir macromoléculas higroscópicas, os proteoglicanos, que possuem grande capacidade para atrair e manter a água.(120)

Inclusamente associada à matriz há dois tipos principais de fibras protéicas: o colágeno, maior constituinte do derma (representa 75% do peso seco e 18-30% do volume do derma) e que possui grande capacidade de fornecer força e forma ao derma, e a elastina, que está em uma proporção menor, sendo responsável pela elasticidade. (120)

Outros componentes microfibrilares importantes para a manutenção da estabilidade, e inclusos na matriz, são: a fibrilina, a microfibrilina associada à glicoproteína, a microfibrilina associada à proteína fibrilar e o colágeno tipo VI.(120)

O colágeno compreende, na realidade, uma família de proteínas muito semelhantes entre si, ainda que geneticamente distintas. São reconhecidos 36 genes diferentes que codificam 21 tipos de colágeno, sendo 16 os tipos presentes

de forma relevante no tegumento cutâneo (tipos I, III, IV, V, VI, VII, VIII, XII, XIII, XIV, XV, XVI, XVII, XVIII, XIX, XX).(121)

Devem ser destacados, em particular, por sua importância constitutiva e funcional, os colágenos tipos I (representa 80% do total de colágeno dérmico) e III (representa 10% do total de colágeno dérmico), responsáveis pela força tensora do derma; o tipo IV, constituinte das membranas basais (compondo a junção dermo-epidérmica, dentro da lâmina densa); o tipo V (representa 5% do total de colágeno dérmico), que possui importância para a migração das células epidérmicas e para a manutenção da força tensil do derma; o tipo VI, que possui papel de ancoragem; o tipo VII, que é o principal componente das fibrilas de ancoragem que se estendem pela junção dermo-epidérmica, conferindo estabilização à mesma; o tipo VIII, presente em células endoteliais e que confere estabilidade estrutural a elas; o tipo XII, que auxilia na modulação da capacidade de deformabilidade da matriz extracelular; o tipo XIII, que integra as junções de aderência, como a junção dermo-epidérmica, e o tipo XVII, que também se constitui em uma proteína transmembrana e está localizado nos hemidesmossomas da zona da membrana basal, sendo que a sua anormalidade possui ação comprovadamente patogênica nas epidermólises bolhosas e no penfigóide bolhoso.(121)

As fibras elásticas, responsáveis pela função de elasticidade do derma, contêm muitas proteínas, entre as quais a elastina e as microfibrilas associadas à elastina, como as fibrilinas I e II, as emilinas e as fibulinas.(122)

A junção dermo-epidérmica possui entre seus componentes do derma, além dos colágenos tipo IV e VII, as glicoproteínas laminina e entactina, e os proteoglicanos.(122)

Para a conexão e ajuste entre os vários constituintes da matriz extracelular, a função dos proteoglicanos é necessária. Essas macromoléculas são compostas pela

ligação covalente de proteínas com cadeias de carboidratos, os glicosaminoglicanos, que estão em grande quantidade na pele.(123)

Os proteoglicanos são importantes ao derma para garantir a adesividade e a integridade, para manter a capacidade de reparo, para manter o equilíbrio hídrico e para equilibrar a síntese e a degradação de constituintes do arcabouço estrutural do derma.(123)

Outros importantes constituintes do derma são seus componentes celulares que incluem os fibroblastos, os mastócitos e os histiócitos (monócitos e macrófagos). Também estão localizados no derma uma extensa rede vascular, feixes e terminações neurais, glândulas écrinas e apócrinas, a unidade pilosebácea e músculos lisos adjuntos à unidade pilosebácea e às arteríolas.(124)

### **2.3. Metaloproteinases da Matriz**

A família das enzimas denominadas metaloproteinases da matriz (MMPs) contribuem para o remodelamento tecidual normal e patológico. Possuem ação na migração celular e agem como moléculas reguladoras, inseridas nos mecanismos de processamento de citocinas, fatores de crescimento e moléculas de adesão, aumentando ou diminuindo determinados efeitos biológicos.(125,126)

As MMPs compõem um grupo de proteinases ou endopeptidases zinco-dependentes e cálcio-dependentes (portanto “metalodependentes”) que funcionam extracelularmente e são capazes de executar funções na manutenção da arquitetura normal da pele. Para isso, as MMPs precisam exercer seus efeitos sobre o depósito, composição e reposição de macromoléculas, como o colágeno, a elastina, os glicosaminoglicanos e glicoproteínas.(127)

Para exercerem suas ações fisiológicas no tegumento cutâneo-mucoso, as MMPs são secretadas por células residentes do epiderma e derma (queratinócitos,

fibroblastos, histiócitos e mastócitos, basicamente), a partir da indução mitocondrial.(127-130) Estas funções são essenciais para a manutenção da morfogênese, da angiogênese e da formação de processos de cicatrização. Alterações da secreção ou regulação destas enzimas podem alterar a degradação das macromoléculas, rompendo o equilíbrio extracelular da derme e contribuindo para o desenvolvimento de processos patogênicos, que podem ser auto-sustentáveis. Entre esses processos são destacados os envolvidos com determinadas neoplasias, doenças inflamatórias, reações do tipo hipersensibilidade imediata mediada por mastócitos e doenças fibróticas.(127,131-133)

A família das MMPs possui subfamílias classificadas em metaloproteinases secretadas e em metaloproteinases tipo-membrana. As secretadas são as colagenases intersticiais (exemplos: MMP-1, -8, -12, -13, -18, -19, -20), as estromelisinases (MMP-3, -10, -11), a matrilisina (MMP-7) e as gelatinases ou colagenases tipo IV (MMP-2, MMP-9). As tipo-membrana são a metaloproteinase tipo membrana 1 (MT1-MMP ou MMP-14), a tipo membrana 2 (MT2-MMP ou MMP-15), a tipo membrana 3 (MT3-MMP ou MMP-16), a tipo membrana 4 (MT4-MMP ou MMP-17), a tipo membrana 5 (MT5-MMP ou MMP-24) e a tipo membrana 6 (MT6-MMP ou MMP-25).(127) Atualmente, compreende-se que há uma série de MMPs secretadas ainda não incluídas nas subfamílias definidas. Entre essas MMPs estão a metaloelastase macrófaga (MMP-12), a MMP-19, a MMP-20, a MMP-23, a MMP-28 e as adamalisinases.(127)

São características comuns das MMPs: a presença de zinco, a ligação octaédrica de íons de cálcio e a inibição por elementos protéicos teciduais específicos das metaloproteinases da matriz.(132,133)

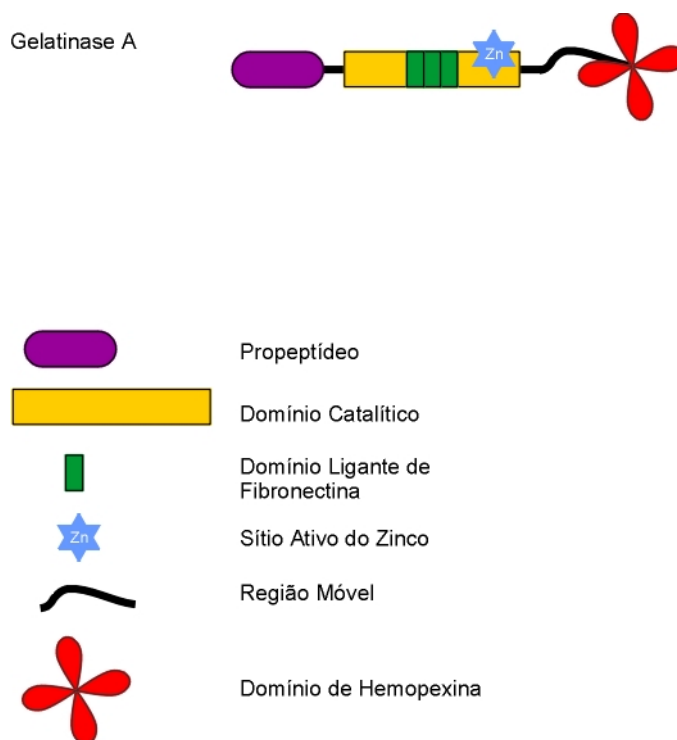
As metaloproteinases possuem uma estrutura propeptídea com a seqüência de aminoácidos PRCVPD (prolina, arginina, cisteína, valina, prolina, ácido aspártico) ligada ao domínio catalítico principal que possui a seqüência de aminoácidos



HEXXHXXGXXHXXXXXXXXM (histidina, ácido glutâmico, variáveis, histidina, variáveis, glicina, variáveis, histidina, variáveis, metionina) que possui o sítio de ligação do zinco.(127)

Do domínio catalítico parte uma estrutura móvel anexando o domínio da hemopexina (possui papel nas especificidades de ligação aos substratos e na regulação da atividade da metaloproteinase).(134) Nas gelatinases, no domínio catalítico, há o domínio da fibronectina, ligador de colágeno e responsável pela especificidade da ação colagenolítica.(127,135)

A figura 2 demonstra, esquematicamente e segundo Seltzer e Eisen, a estrutura geral e os componentes dominantes dessas enzimas, utilizando, como exemplo, a gelatinase A.(127)



**Figura 2** – Estrutura e componentes das metaloproteinases.

A semelhança estrutural entre as enzimas sugere precursores em comum. Por exemplo, a collagenase MMP-1 e a estromelisina (MMP-7) possuem 10 exons virtualmente idênticos em peso e, juntamente com a collagenase MMP-13, estão mapeadas no braço longo do cromossoma 11.(133,136)

Já os genes das gelatinases A (MMP-2) e B (MMP-9), com 3 exons adicionais, estão localizados no cromossoma 16.(137)

O eixo regulatório para a secreção e ativação das MMPs é fundamental, no sentido da manutenção das características essencialmente fisiológicas de suas ações. A regulação da expressão e ação das MMPs é realizada por: 1) citocinas, fatores de crescimento e interações entre as células do epiderma e do derma e entre a matriz e essas células; 2) ativação da sua forma pró-enzima (zimógeno); e 3) presença dos inibidores das metaloproteinases.(138)

As MMPs são secretadas sob forma zimogênica inativada, a partir da estimulação de queratinócitos, de células inflamatórias (principalmente leucócitos e macrófagos), de mastócitos, de fibroblastos e de células endoteliais, por citocinas inflamatórias (como a interleucina 1 alfa e o fator de necrose tumoral alfa) e por fatores de crescimento (como o fator de crescimento transformador beta).(6,138-141)

Determinadas metaloproteinases também podem ser secretadas por glândulas sebáceas e écrinas, como a denominada endopeptidase neutra.(142)

Na forma inativada, as MMPs são incapazes de realizar a proteólise. A latência é mantida pela ligação entre a cisteína no domínio da proenzima e o zinco no sítio catalítico. A ativação envolve a remoção do domínio propeptídeo, expondo o zinco (mecanismo denominado de “modelo de alteração da cisteína”).(127) Essa dissociação é realizada por autocatálise ou pela ação de enzimas, como a furina, a plasmina, a monensina, a tripsina ou outras MMPs (principalmente a estromelisina e as metaloproteinases tipo-membrana).(6,127,141)

Além do mecanismo clássico da alteração da cisteína, foi demonstrado que, *in vitro* e sob condições patológicas, o peroxinitrito gerado a partir do óxido nítrico e do ânion superóxido ativa formas zimogênicas de metaloproteinases.(143)

Ativadas, as MMPs, já com menor peso molecular, estão ligadas a proteínas plasmáticas, como a alfa-2 macroglobulina, e são inativadas por inibidores protéicos específicos, expressos por várias tipos de células (como fibroblastos, por exemplo) e presentes em muitos fluidos corporais.(132)

São quatro os inibidores naturais específicos das metaloproteinases, denominados de inibidores teciduais das metaloproteinases (TIMPs): TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 e TIMP-4. Uma ligação não-covalente da MMP, com equivalência molar a um TIMP específico, ocasiona a inibição da enzima em sua forma ativa.(132,133)

É o estado de equilíbrio estável desse eixo funcional que irá acarretar a manutenção de processos fisiológicos, como o constante remodelamento tecidual do derma.(144,145)

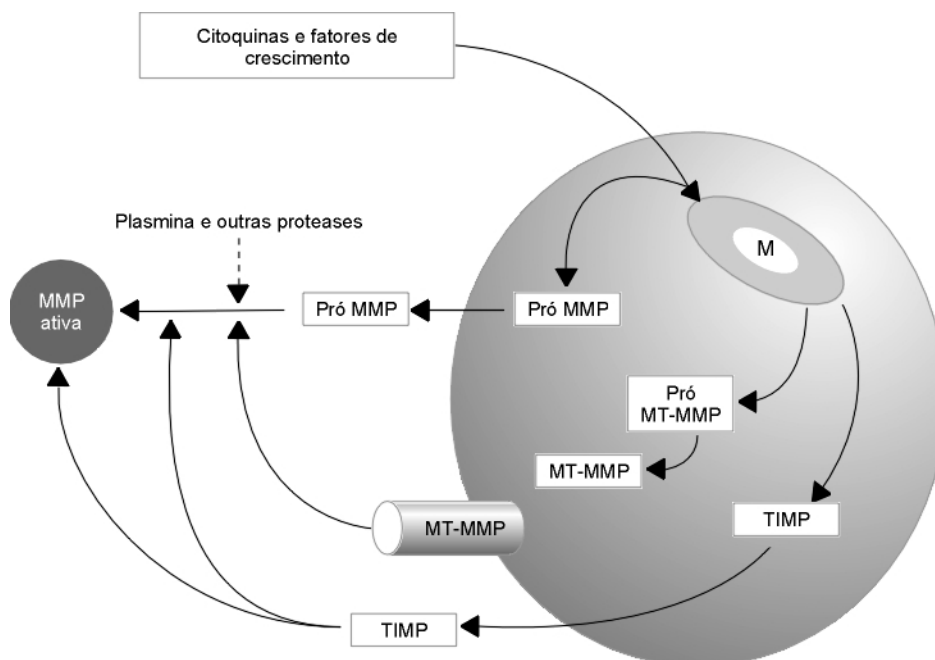
Além dos inibidores naturais, são reconhecidos como inibidoras das metaloproteinases determinadas drogas como os retinóides e o grupo das tetraciclina.(127,146)

Nesse grupo, a doxiciclina é a que possui a maior atividade inibitória, quando comparada à tetraciclina e à minociclina. Em ratos, a inibição das MMPs por esse grupo de antibióticos pode ser parcialmente revertida pelo acréscimo de quantidades excessivas de zinco.(146)

Recentemente, inibidores específicos das metaloproteinases têm sido sintetizados no sentido de bloquear determinadas ações das MMPs que rompem com o equilíbrio fisiológico e contribuem para o desenvolvimento de doenças. Entre esses inibidores estão os com base em tióis, sulfodiimina e hidroximatos.(126,138)

A partir de uma adaptação do trabalho apresentado em 2003 por Sampaio (147) e considerando a síntese da literatura realizada por Seltzer & Eisen,(127) é

possível apresentar, esquematicamente, o mecanismo geral de expressão, ativação e inibição das metaloproteinases (figura 3):



**Figura 3** – Célula estimulada, elaboração e regulação das metaloproteinases. M: mitocôndria; Pró MMP: metaloproteinase de matriz inativada; Pró MT-MMP: metaloproteinase da matriz tipo membrana inativada; TIMP: inibidor tecidual das metaloproteinases; MT-MMP: metaloproteinase da matriz tipo membrana; MMP: metaloproteinase da matriz.

### As gelatinases (colagenases tipo IV)

Os dois tipos de metaloproteinases da matriz que degradam principalmente o colágeno tipo IV são nominadas de gelatinases A e B ou colagenases tipo IV.(138) Ambas catalizam a clivagem deste tipo de colágeno em uma porção pepsina-resistente da molécula, porém elas não conseguem clivar de forma importante os colágenos intersticiais (tipo I, II ou III).(127,138,139)

Essas enzimas são chamadas de gelatinases por possuírem uma marcada especificidade na desnaturação do colágeno (também denominado de gelatina), enquanto substrato protéico, e degrad -lo em vários pequenos fragmentos. Esta

ação complementa a das colagenases intersticiais sobre a “gelatina” com uma maior rapidez (a gelatinase A é 100 vezes mais rápida na degradação da gelatina quando comparada às colagenases intersticiais).(148)

A gelatinase A, denominação da colagenase tipo IV 72 kDa e reconhecida por ser a metaloproteinase da matriz-2 (MMP-2), teve sua estrutura primária completa inicialmente esclarecida a partir de células epiteliais brônquicas humanas, sendo idêntica à enzima que atualmente vem sendo isolada de culturas de fibroblastos da pele humana.(149)

A MMP-2 inativada apresenta peso molecular de 72 kDa e de 62 kDa, quando ativada, sendo capaz de clivar uma série de substratos protéicos, inclusive os peptídeos do colágeno em pequenos resíduos de aminoácidos.(127) A clivagem da gelatinase A ocorre sobre os substratos: colágenos tipo I, IV, V, VII, X, XI e XIV, elastina, fibronectina, laminina, agrecan e proteína mielínica básica.(142-148)

A ativação da pró-enzima MMP-2 necessita principalmente da ação da IL-1 e do FNT-alfa, que por intermédio da ativação do fator nuclear kappa beta promovem a transcrição ao ácido ribonucléico mensageiro (mRNA) da metaloproteinase da matriz do tipo membrana (MT1-MMP).(150) A MT1-MMP, por sua vez, age na ativação da enzima pró-MMP-2.(150-152)

A importância da MT1-MMP e da estrutura fibrilar do colágeno para a ativação da MMP-2 foi demonstrada por Ruangpanit *et al.*, que verificaram a incapacidade dos fibroblastos de ratos com deficiência dessa metaloproteinase em ativar a forma zimogênica da MMP-2.(151)

*In vitro* foi verificado que a produção e ativação da gelatinase A são diminuídas por anticorpos anti-MT1-MMP, pelo bloqueio da síntese da MT1-MMP e pela adição do TIMP-2.(149) Um estudo sugere que a ativação da pró-MMP-2 seja regulada na superfície celular e que, provavelmente, a expressão da MT1-MMP, enzima fundamental para a ativação seja regulada por integrinas.(152)

Apesar da importância da MT1-MMP para a ativação da MMP-2, uma ativação residual independente da MT1-MMP foi identificada utilizando cultura de fibroblastos enriquecida por ácido ascórbico.(153) Além disso, a clivagem dos componentes da matriz pela MMP-2 pode resultar em mais indução secretória e ativação enzimática. Desta forma, a fibronectina e a laminina são substratos para ação da MMP-2 e também estimulam sua liberação e ativação.(154)

A gelatinase B, também denominada colagenase tipo IV 92 kDa (peso molecular de sua fase pré-ativa), possui peso molecular de 82 kDa quando ativada, e é reconhecida por ser a metaloproteinase da matriz-9 (MMP-9).(29) Sua estrutura primária completa foi inicialmente definida a partir do estudo de fibroblastos pulmonares de humanos, sendo idêntica às metaloproteinases 92 kDa secretadas por macrófagos, granulócitos, queratinócitos, células de leucemia monocítica, células citotrofoblásticas e células de fibrossarcomas.(155)

O fator de necrose tumoral alfa e o fator de crescimento transformador beta agem de forma sinérgica na secreção da forma zimogênica da MMP-9; e o FNT-alfa age na ativação dessa em MMP-9 ativa, com 82 kDa. Tal ação é evidenciada pelo aumento do mRNA da MMP-9 nos fibroblastos dérmicos.(156)

A MMP-9 é capaz de desnaturar colágenos e de clivar vários substratos da matriz, a saber: os colágenos tipos IV, V, VII, X e XIV, a elastina, a entactina, o agrecano, a fibronectina, a osteonectina, o plasminogênio e a proteína básica da mielina.(127)

Embora ambas gelatinases desnaturem um perfil semelhante de componentes protéicos da matriz, verifica-se que a MMP-2 é duas vezes mais potente para a ação contra o colágeno tipo I, enquanto a MMP-9 digere o colágeno tipo IV duas a três vezes mais rapidamente que a MMP-2.(127)

Os genes que codificam a secreção da MMP-9 possuem um sítio que liga fatores iniciadores da transcrição e muitos elementos denominados de

“amplificadores”. O melhor amplificador já caracterizado é a sequência com oito pares de base TGAGTCAC, denominado sítio ativador de proteína 1 (AP-1).(127) Sobre o AP-1, agem no aumento da síntese da MMP-9, os fatores de crescimento, o fator de necrose tumoral alfa, as leucorregulinas e a radiação ultravioleta. Especificamente, a síntese da MMP-2 não é amplificada pelo sítio AP-1, havendo outros amplificadores e respostas variadas a diferentes citoquinas.(127)

A produção das gelatinases pode ser diminuída pelos glicocorticoesteróides e pelos retinóides, que podem suprimir a atividade dos amplificadores.(127)

A regulação da atividade enzimática das MMPs é realizada por inibidores teciduais proteíno-específicos das metaloproteinases, os TIMPs. Para as gelatinases A e B, os inibidores importantes são o TIMP-1 e o TIMP-2.(157)

O TIMP-1 é uma glicoproteína, com peso molecular de 28 kDa, secretada pelos queratinócitos e fibroblastos humanos normais e com gene codificador localizado no cromossoma X. Possui 184 aminoácidos e inibe a atividade das MMPs ao ligar-se com o sítio ativo das mesmas, por intermédio de pontes dissulfídicas. Essas estão inclusas em dois grandes domínios. Um domínio inibe a forma zimogênica da MMP-9 e o outro inibe as formas ativas das outras metaloproteinases.(134,157)

O TIMP-2 é uma proteína não glicosilada, com peso molecular de 21 kDa, secretada por queratinócitos e fibroblastos e com gene codificador localizado no cromossoma 17. Possui 194 aminoácidos e age sobre a forma zimógena, inibindo a atividade da MMP-2.(134,157)

A interação dos TIMPs às gelatinases A e B, portanto, envolve as formas zimógenas destas enzimas. A regulação destes inibidores pode ser realizada por vários agentes, entre os quais estão os retinóides, o FCT-beta e as interleucinas 1 e 6; todos aumentando principalmente a secreção do TIMP-1. Referente à regulação

do TIMP-2, o conhecimento é menor, mas provavelmente exista uma regulação independente do TIMP-1.(127,157)

Há muitas evidências das ações fisiológicas e patogênicas das metaloproteinases em geral e das gelatinases A e B, especificamente, em diferentes órgãos e sistemas humanos.

Fisiologicamente, a participação das MMPs ocorre na morfogênese, na cicatrização, na reprodução, na imunidade e na angiogênese. Especificamente, as gelatinases A e B já foram demonstradas como mediadoras do ciclo menstrual e na involução fisiológica da glândula mamária, por exemplo.(125,133,158)

Como outro exemplo dessas ações das gelatinases há o trabalho de Stephens *et al.*, demonstrando por zimografia que os fibroblastos da mucosa oral produzem quantidades maiores de MMP-2 que os fibroblastos da pele, podendo ser esse um dos principais motivos para a mais rápida cicatrização de lesões erosadas na mucosa oral.(159)

São citadas como doenças ou estados patológicos que evoluem com a participação das gelatinases A e/ou B: a artrite reumatóide, a artrite psoriática, a esclerose sistêmica, a fibrose hepática, a osteoartrite, o enfisema pulmonar, a aterosclerose, a esclerose múltipla, o aneurisma da aorta abdominal, as úlceras de córnea, a distrofia de Sorsby, a doença periodontal, a doença das veias varicosas, a borreliose (doença de Lyme), a infecção pelo *Helicobacter pylori*, a síndrome de Sjögren e determinadas neoplasias (como o carcinoma pulmonar e tireoideo).(127,158-168)



### Gelatinases A e B e doenças dermatológicas

A participação das gelatinases nos mecanismos fisiopatogênicos de algumas doenças dermatológicas importantes pode ser registrada. Alguns exemplos são descritos a seguir:

- Psoríase: em um estudo imunoistoquímico com 19 pacientes com psoríase, foram demonstradas a expressão da MMP-2 em 15 pacientes, em localização preferencial na derme papilar, e da MMP-9 em 14 pacientes, preferencialmente em queratinócitos e na derme papilar perivascular.(169) Usando técnicas imunoenzimáticas e PCR, demonstrou-se a ausência dos inibidores TIMP-1 e TIMP-2 em todos os 19 pacientes com psoríase analisados.(169) Através da hibridização *in situ*, Suomela *et al.* demonstram uma elevação da expressão da MMP-9 por macrófagos da pele com psoríase. Porém como o inibidor TIMP-1 também esteve elevado, esse autores acreditam que somente a expressão elevada da MMP-9 não contribua para as alterações teciduais da psoríase.(170)

- Líquen plano: a expressão imunoistoquímica da MMP-9 em queratinócitos nas fases agudas e crônicas do líquen plano foi similar à expressão em áreas não envolvidas pelo líquen plano e em pele de controles sem a doença, porém a expressão da MMP-2 na zona da membrana basal foi maior que aquela observada nos controles, sugerindo uma possível participação patogênica dessa enzima, possivelmente na digestão da laminina, contribuindo para uma alteração na expressão da integrina.(171)

- Epidermólise bolhosa: Winberg & Gedde-Dahl Jr. estudaram a expressão das gelatinases, através de cultura com fibroblastos, em 12 indivíduos normais, 11 pacientes com epidermólise bolhosa simples, 16 com outros tipos de epidermólise bolhosa e 2 com deficiência de prolidase. Foi demonstrado que as gelatinases estão predominantemente expressadas na epidermólise bolhosa simples.(9)

- Anetodermia: áreas lesionais de 3 pacientes com anetodermia foram analisadas e comparadas com áreas de pele não afetadas dos mesmos indivíduos em relação à expressão de formas pró-ativas das gelatinases A e B e à forma ativada da gelatinase A, através de cultura e zimografia. Foi verificado um aumento da expressão das formas pró-ativas e da forma ativada da gelatinase A apenas nas áreas de pele com lesões.(172) Em estudo recente, através de meios seletivos de cultura, foram identificadas e quantificadas determinadas metaloproteinases em áreas com anetodermia de 5 pacientes e comparadas com a pele normal de 2 indivíduos doadores. Foram verificadas elevações das MMP-9, MMP-3 e MMP-7 apenas na pele dos pacientes com anetodermia. Segundo os autores, essas enzimas podem participar da patogênese da anetodermia por degradarem a elastina.(173)

- Necrólise epidérmica tóxica e penfigóide bolhoso: através de gelatina marcada com  $^3\text{H}$  e da zimografia, foram determinadas a expressão e a atividade das gelatinases A e B no fluido bolhoso de 6 pacientes com necrólise epidérmica tóxica, comparando com os achados em 6 pacientes com penfigóide bolhoso, 13 de queimaduras de segundo-grau e 3 com bolhas por sucção. A MMP-2 foi encontrada de forma estatisticamente significativa em pacientes com necrólise epidérmica tóxica. Ao contrário, a MMP-9 foi estatisticamente superior nos pacientes com penfigóide bolhoso.(8)

- Dermatite por estase venosa: as presenças da MMP-2 e dos inibidores das metaloproteinases TIMP-1 e TIMP-2 foram avaliadas por reação da cadeia da polimerase, *western blot* e imunistoquímica na fase aguda da insuficiência venosa crônica. Ao serem comparadas com a pele de controles saudáveis, a expressão da MMP-2 esteve aumentada, e a dos inibidores diminuída, nas lesões de dermatite de estase.(174)

- Úlceras cutâneas: usando o método de gelatina marcada com  $^3\text{H}$  e zimografia, foi demonstrado que as atividades de MMP-2 e MMP-9 estão aumentadas na cicatrização de úlceras na pele de porcos, porém em momentos diferentes do processo cicatricial. Enquanto a MMP-2 foi encontrada na fase final da cicatrização, melhor definida como remodelamento tecidual, ou seja, a fase mais próxima da situação de pele normal, a MMP-9 foi encontrada nas fases iniciais após a formação da úlcera, o que condiz com seu envolvimento nas etapas de reparação precoce (através do processo inflamatório e desnaturação do colágeno).(6) Bullen *et al.* demonstraram, através dos métodos de radioimunoensaio e zimografia, que em fluido de feridas pós-mastectomia, a MMP-9 aumenta nas primeiras 48 horas e, após esse período diminui, quando começa a elevar-se a MMP-2.(175) O inibidor tecidual das metaloproteinases TIMP-1 aumenta também nos dois dias seguintes à cirurgia, diminuindo em seguida. Esses achados contrastaram com o verificado em úlceras crônicas causadas por estase venosa (no mínimo com 6 meses de evolução), nas quais se demonstrou uma diminuição dos níveis do inibidor tecidual das metaloproteinases TIMP-1 e um aumento de ambas as gelatinases.(175) Em outro trabalho, Yager *et al.*, analisando o fluido cutâneo ulceroso através de zimografia, verificaram que os níveis de MMP-2 e MMP-9 nas úlceras de pressão foram, respectivamente, 10 e 25 vezes superiores aos encontrados nas feridas operatórias agudas. A presença excessiva dessas metaloproteinases, rompendo o equilíbrio com seus inibidores, poderia contribuir para a não cicatrização das úlceras de pressão. Os novos tratamentos deveriam estar atentos a essa possibilidade.(176) Mais recentemente, em 2000, Cook *et al.* demonstraram que não há diferenças estatisticamente significativas na produção da MMP-2 pelos fibroblastos da pele de úlceras crônicas e da pele normal. Porém, essa diferença existe ( $p < 0,01$ ) quando é analisada a presença da forma ativa da MMP-2 (com 62 kDa), já que ela esteve diminuída nas úlceras crônicas.(177) Os autores acreditam que esse fato esteja

associado ao aumento da secreção pelos fibroblastos dos inibidores das metaloproteinases TIMP-1 e TIMP-2, encontrados nesses pacientes ( $p < 0,05$ ).

- Quelóides e cicatrizes hipertróficas: a análise da pele de 10 indivíduos com cicatrizes hipertróficas, 9 com quelóides e 10 doadores normais, através de zimografia, não demonstrou aumento da presença e atividade da MMP-9 nos quelóides e cicatrizes hipertróficas, mas demonstrou aumento da presença e atividade da MMP-2 nos quelóides e cicatrizes hipertróficas, quando comparados à pele normal.(178) Os achados concluem pela participação da MMP-2 em processos de remodelamento prolongado, enquanto a MMP-9 não agiria nessa fase.(178)

- Neoplasias cutâneas: os efeitos provocados pelas metaloproteinases na degradação do colágeno, no estímulo à migração celular e no estímulo para neovascularização podem ser importantes para o desenvolvimento tumoral e para a invasão tecidual posterior.(11) A metaloproteinase 1 foi encontrada, por método de hibridização *in situ*, nas lesões do tipo nódulo-ulcerativo do carcinoma basocelular, mas não nas lesões do tipo superficial.(179) Pelo mesmo método, a MMP-1 foi encontrada em lesões de ceratose actínica isoladas, em ceratoses actínicas associadas ao carcinoma epidermóide e nos queratinócitos e estroma do carcinoma epidermóide. A expressão da metaloproteinase 3 parece estar ligada à expressão da MMP-1.(179) A expressão da MMP-2 no carcinoma epidermóide ocorreu apenas no estroma adjacente ao tumor e, quanto à expressão da MMP-9 por método de imunistoquímica, verificou-se pequena expressão no estroma ou nas células tumorais.(179) Segundo o trabalho publicado por Varani *et al.*, em 2000, com o estudo de 54 espécimes cutâneas de carcinoma basocelular, a expressão imunistoquímica das gelatinases A e B não ajudou a diferenciar o grau de agressividade desses carcinomas.(180) Já nos melanomas, foram demonstradas atividades aumentadas das gelatinases A (principalmente) e B, em análise realizada através da zimografia, particularmente se exposto aos efeitos do interferon alfa e

gama, o que poderia aumentar o risco para metástases.(10) Quanto à espessura do melanoma, Ooard *et al.* (1997) encontraram, através da imunistoquímica, que a MMP-9 apresenta-se com maior expressividade em melanomas considerados de espessura fina (entre 19 casos, 63% dos melanomas com espessura < 1,6 mm e apenas 1 com > 1,6 mm ). Não ocorreu expressão em nevos, lentigos malignos e lesões metastáticas de melanoma.(11) Já a MMP-2 foi encontrada em níveis de Clark mais elevados, possuindo, inclusive, um possível papel prognóstico.(181) Em um estudo utilizando imunistoquímica e zimografia, foi verificada a presença da MMP-2 em metástases de melanoma.(182)

Através da imunistoquímica e utilizando métodos de análise semi-quantitativo e qualitativo, Bodey *et al.* demonstraram a presença focal (1+) e intensa (A,B) das MMP-2 e -9 em processos angiogênicos e de expansão focal em melanomas *in situ*.(183) Wollina *et al.*, em 2001, demonstraram que a determinação sérica da MMP-2 por método de ELISA possui um valor limitado como marcador tumoral no melanoma, apesar de serem encontrados altos níveis dessa metaloproteinase em doença avançada.(184) Em um estudo publicado em 2002, foi demonstrado por imunistoquímica e zimografia que a MMP-2 é a principal enzima gelatinolítica atuante no melanoma, com presença em 28 de 41 casos de melanoma primário e 6 de 6 casos de metástases.(185)

- Fotoenvelhecimento cutâneo: fibroblastos de uma pele suína submetida agudamente à irradiação gama exibem um aumento de sua proliferação, enquanto que o derma circunjacente possui um aumento da síntese de componentes da matriz extracelular.(186,187) Em um trabalho realizado com irradiação em doses de 30, 40 e 64 Gy, sob taxas de 1-6 Gy/min, foi analisada a pele de suínos e verificou-se que a MMP-2 não estava com sua atividade elevada, concluindo-se pelo provável papel de remodelamento a longo prazo dessa enzima.(188)

Um estudo sobre as características do derma de pacientes com psoríase submetidos ao tratamento com radiações ultravioleta A (11 pacientes) e ultravioleta B (8 pacientes), quanto à expressão das gelatinases, demonstrou que ambas as radiações aumentaram a expressão das gelatinases A e B quando comparadas aos 7 pacientes controles, que não haviam recebido as radiações. Especialmente importante foi a grande presença da gelatinase A em pacientes com marcada elastose.(189)

Em trabalho publicado em 1997, foi demonstrado, através da zimografia e do *western-blot*, os níveis das gelatinases 24 horas após a irradiação com ultravioleta A e B.(190) Verificou-se que a secreção da forma latente da MMP-2 pelos fibroblastos era pouco modificada, mas ocorria uma maior ativação da forma zimogênica em sua forma ativa. Já as exposições à UVA, UVB e a ambas simultaneamente, aumentaram a secreção da forma pró-ativa da MMP-9, mas não aumentaram sua forma ativa, indicando uma provável necessidade da participação de efetores inflamatórios (existente apenas *in vivo*), como outras proteinases leucocitárias e fatores ativados pelo oxigênio.(190)

O fotoenvelhecimento cutâneo foi explicado, em 1997, por pesquisadores que demonstraram, esquematicamente, um modelo hipotético sobre a influência dos raios ultravioleta A e B na secreção de metaloproteinases da matriz por queratinócitos e fibroblastos.(191) Haveria degradação do colágeno pela enzimas e, com a reparação do dano, seriam formadas verdadeiras escaras cicatrizadas no derma, ocorrendo a elastose e a fibrose.

Também foi demonstrado que a tretinoína tópica diminuía a indução da expressão da MMP-9 no epiderma e no derma, mas não inibia a indução do inibidor tecidual das metaloproteinases-1.(191) Tal verificação pode ser um dos mecanismos para a compreensão da ação benéfica dessa medicação no fotoenvelhecimento cutâneo. O estudo foi realizado com 59 pacientes que, após

exposição à radiação ultravioleta, foram biopsiados e tiveram suas amostras analisadas por hibridização *in situ*, imunistoquímica e zimografia.(191)

Em outro trabalho, foi demonstrado que mesmo pequenas quantidades de UVA podem induzir a elaboração de muitas metaloproteinases da matriz, entre elas a MMP-2 e a MMP-9.(192) Essas enzimas degradam componentes da matriz extracelular e, ao mesmo tempo, inibem a síntese de procolágeno. Essa ação da radiação UVA seria mediada por proteinoquinas mitógeno-ativadas que agiriam sobre amplificadores, principalmente o AP-1.(192)

Além dessas dermatoses, as gelatinases A e B são também citadas na literatura como participantes dos mecanismos patogênicos das seguintes doenças dermatológicas: hanseníase, dermatite de contato por hipersensibilidade tardia, esclerodermia, dermatofibroma e lipodermatoesclerose.(147,193-197)

#### Métodos para o estudo das metaloproteinases-2 e -9 na pele

Há uma série de métodos que servem para confirmar a presença das MMPs, sendo que a empregabilidade dos mesmos é essencialmente experimental.

Além de considerar as características intrínsecas de cada método, a escolha do mesmo para um determinado estudo está na dependência do tipo de amostra biológica a ser estudada e da disponibilidade factual do método.

Entre os dois mais empregados, estão a imunistoquímica e a zimografia. Para a demonstração indistinta das formas inativadas e ativadas presentes em material biológico sólido, *in vivo*, a imunistoquímica é um método adequado. Por outro lado, para determinar o nível de atividade das enzimas de espécimes fluidas e após cultivo celular, a zimografia é uma das mais utilizadas.(8,198)

Estão citados abaixo os métodos de maior importância para a análise das metaloproteinases da matriz:

- Zimografia: processo de desnaturação da MMP por eletroforese para determinação da atividade. Consegue mensurar ambas as formas das enzimas, a latente e a ativa, já que é um método que ativa as formas pró-enzimáticas. A quantificação das MMPs é realizada pelo uso do cultivo de células padrão. Ocorre a incubação do gel para permitir que as enzimas degradem a gelatina. Curvas específicas para cada gel são realizadas. Esse método é útil para diferenciar as gelatinases em relação às suas atividades.(198,199)

- *Western-blotting*: são utilizados anticorpos monoclonais para identificação das formas latentes e ativas das enzimas.(200,201)

- *Northern blot*: é realizada análise de bandas imunorreativas, utilizando-se RNA isolado pelo método de extração guanidina-tiocianato/fenol-clorofórmio.(7,202)

- Imunoistoquímica: utilizando amostras de tecidos parafinados, é realizada uma coloração especial que demonstra a ligação tecidual entre antígeno (MMPs) e anticorpo específico, policlonal ou monoclonal.(8,169,173,183,203-207)

- Radioisótopo: a atividade gelatinolítica pode ser confirmada utilizando gelatina marcada com  $^3\text{H}$  que, porém, não avalia separadamente as diferentes gelatinases. É utilizado colágeno purificado de pele de bovino fetal, que é marcada com anidrido acético  $^3\text{H}$  para uma atividade específica de colágeno. É realizada a cintilação espectrométrica para a mensuração da radioatividade dos fragmentos de gelatina.(6,8,188)

- Hibridização *in situ*: é realizada a aplicação da mistura de hibridização, contendo RNA-*probe* radioativo após procedimento de incubação, lavagem e tratamento com proteinase K, tratamento com glicina, lavagem, imersão da amostra em paraformaldeído a 4%, acetilação, desidratação e secagem ao ar.(189,191)

- Outros métodos também empregados, mas em menor escala, são a citometria de fluxo (usa meios de cultura ativados, proporcionando análise de formas latentes e ativadas, diferenciando-as), a reação em cadeia da polimerase (usados



oligonucleotídeos como *primer* seqüencial e reverso) e o método de ELISA para fluidos em geral.(29,191,197,199,200)

#### **2.4. Imunoistoquímica**

A imunoistoquímica (IQ) é uma técnica utilizada na medicina há mais de 60 anos.(208) Empregada inicialmente para a compreensão e diagnóstico das doenças auto-imunes, na Dermatologia, seu uso foi efetivamente iniciado há aproximadamente 30 anos.(209)

A importância da IQ no estudo das doenças dermatológicas foi demonstrada em 1975 por Boorsma *et al.* que verificaram, após análise de 121 espécimes de 81 pacientes com lúpus eritematoso, penfigóide bolhoso, pênfigo vulgar e rosácea, que a imunoperoxidase era um método imunoistoquímico superior ao método de ponte enzima-imunoglobulina, sendo comparável à imunofluorescência direta. Especificamente em relação à rosácea, os autores avaliaram 11 pacientes e encontraram IFD positiva em 6, igual número de positividade encontrada com a imunoperoxidase.(210)

#### **Os métodos imunoenzimáticos**

Segundo Taylor, a imunoistoquímica reúne os métodos de imunofluorescência (direta e indireta) e os métodos imunoenzimáticos, que auxiliam no desenvolvimento de novos diagnósticos e possibilitam investigações em pesquisas sobre as etiopatogêneses de doenças.(208)

O princípio dos métodos imunoenzimáticos está baseado na visualização da capacidade de ligação de um anticorpo a um antígeno.(208)

Os anticorpos (Ac) pertencem a um grupo de proteínas, as imunoglobulinas (Ig), conhecidas como IgG, IgM, IgA, IgD, IgE, obtidos através da imunização de animais com antígenos específicos e classificados em policlonais e monoclonais.(209)

Os Ac policlonais são produzidos *in vivo* por variadas células, são diferentes quanto às características imunoquímicas, reagem com várias moléculas presentes no antígeno e, portanto, não possuem grande especificidade. Ao contrário, os anticorpos monoclonais são produzidos *in vitro* por clones de células plasmáticas imortalizadas (hibridomas), reagem com uma só molécula (epítipo) presente no antígeno e, portanto, possuem grande especificidade.(208,210)

Além desta vantagem para o seu emprego em imunoistoquímica, os Ac monoclonais podem ser produzidos em larga escala (pois a célula imortalizada é expandida em meio de cultura) e são altamente homogêneos, com elevado grau de reprodutibilidade lote a lote. Porém, para o seu bom emprego, os epítipos alvos devem sobreviver após fixação (pois os Ac monoclonais não reagem em condições subótimas) e o epítipo alvo deve ser único para um determinado antígeno (para evitar a reação cruzada e a perda da especificidade).(208,209)

Os métodos imunoenzimáticos consistem em um grupo no qual são processadas transformações químicas específicas de uma substância solúvel sem cor com um produto precipitado corado por um processo enzimático e são utilizados para identificação e localização de antígenos intracelulares e extracelulares, através de luz microscópica padronizada.(208,210)

Entre os métodos imunoenzimáticos a técnica mais utilizada é a imunoperoxidase. A peroxidase é uma enzima com peso molecular de 40 kDa, consistindo em 8 cadeias periféricas de carboidratos e o *core* de heme-proteína. Ela reduz o  $H_2O_2$  (substrato) em  $H_2O$  e oxida o cromógeno a um produto corado, ocorrendo a precipitação deste produto ao redor do sítio de ligação do anticorpo com

o tecido. O substrato enzimático (cromógeno) mais amplamente utilizado é 3-3' diaminobenzidina (DAB), conferindo uma reação que produz coloração amarronzada, altamente insolúvel em solventes orgânicos e elétron-densa.(208)

Para a coloração, muitos são os métodos utilizados. Destacam-se: método direto, método indireto, método peroxidase-anti-peroxidase, método fosfatase alcalina-antifosfatase alcalina, método polímero de dextrana, método de multicoloração e método para coloração de animais.(208)

Porém, os mais utilizados são os métodos que utilizam o recurso da amplificação, o que aumenta a sensibilidade da reação. Entre esses estão o anticorpo secundário marcado com biotina e a enzima ligada em um complexo com a avidina ou a estreptoavidina, o anticorpo secundário marcado com biotina e a enzima ligada diretamente à avidina ou à estreptoavidina, e o anticorpo secundário marcado com biotina e biotinil tiramida. Na seqüência, há a revelação da reação com substrato cromógeno, em geral a diaminobenzidina, que confere às regiões positivas uma coloração amarronzada.(208)

#### Aplicações atuais da imunoistoquímica no diagnóstico de dermatoses

De acordo com Kanitakis *et al.*,(212) as técnicas de imunoistoquímica podem ser úteis no estudo de sete grupos de doenças dermatológicas: 1) doenças bolhosas auto-imunes (penfigóide bolhoso, penfigóide cicatricial, penfigóide gestacional, pênfigo vulgar, pênfigo paraneoplásico, pênfigo foliáceo, pênfigo induzido por drogas, pênfigo IgA, dermatite herpetiforme, doença IgA linear, epidermólise bolhosa adquirida); 2) doenças bolhosas hereditárias (epidermólise bolhosa); 3) dermatoses inflamatórias e auto-imunes (lúpus eritematoso, esclerodermia, dermatomiosite, psoríase, dermatite atópica, dermatite de contato, líquen plano); 4) doenças metabólicas (porfiria cutânea, amiloidose); 5) doenças vasculares (vasculite

cutânea); 6) infecções cutâneas (virais, bacterianas, fúngicas, por protozoários); e 7) tumores cutâneos (linfomas, pseudolinfomas, histiocitoses, tumores epiteliais, tumores neuroendócrinos, tumores mesenquimais, tumores metastáticos).

A rosácea não é citada individualmente, mas se ocorresse a sua inclusão em um desses grupos, poderia compor o grupo 3, como doença inflamatória ou o grupo 5, como doença vascular.

#### A expressão cutânea à imunistoquímica das metaloproteinases-2 e -9

Desde que estimuladas, há células da pele humana que secretam formas latentes das MMPs-2 e -9, posteriormente ativadas por outros mediadores para exercerem suas ações.(6,213)

A gelatinase A seria a única metaloproteinase que poderia ser sempre encontrada, mesmo em condições de normalidade funcional cutânea, enquanto que a gelatinase B, para ser diagnosticada no tecido cutâneo, necessitaria de estímulo(s) extra-fisiológico(s).(144,145)

De acordo com os estudos prévios, é esperado que através da imunistoquímica sejam visualizadas as fontes de elaboração das metaloproteinases na pele e, eventualmente, nas áreas estromais adjacentes.(171,179-182,204) Essas fontes são os queratinócitos (principalmente de MMP-9), os fibroblastos (principalmente de MMP-2), as células inflamatórias, particularmente os neutrófilos e os macrófagos, as células endoteliais (principalmente de MMP-2) e, talvez, as glândulas sebáceas e écrinas.(8,142,191,213-215)

É de importância o trabalho de Keski-Oja *et al.* demonstrando que as gelatinases não somente são secretadas por fibroblastos, mas que se depositam ao redor dessas células, portanto na matriz extracelular, sob forma zimogênica e ativada.(216)

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo principal

Verificar a presença da MMP-2 e da MMP-9 na pele lesional de portadores de rosácea inflamatória, comparando com a presença das mesmas na pele lesional de pacientes com outras doenças dermatológicas inflamatórias.

#### 3.2. Objetivos secundários

1. Avaliar a existência de associação entre os estágios clínicos da rosácea inflamatória e de suas variantes e a expressão imunoistoquímica da MMP-2 e da MMP-9.

2. Avaliar a existência de associação e correlação entre a presença do *Demodex folliculorum* nos pacientes portadores de rosácea inflamatória e a expressão imunoistoquímica da MMP-2 e da MMP-9.

3. Avaliar a existência de correlação dos fototipos cutâneos de pacientes portadores de rosácea inflamatória com a expressão imunoistoquímica da MMP-2 e da MMP-9.

#### 4. REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA

- 1- GREAVES MW. Flushing and Flushing Syndromes, Rosacea and Perioral Dermatitis. In: CHAMPION RH, BURTON JL, BURNS DA, BREATHNACH SM, editors. Rook/Wilkinson/Ebling Textbook of Dermatology. 6<sup>th</sup> ed. Oxford: Blackwell Science; 1998. p.2099-2112.
- 2- PLEWIG G, KLIGMAN AM. Rosacea. In: PLEWIG G, KLIGMAN AM, editors. Acne e Rosacea. 3<sup>rd</sup> ed. Berlin: Springer-Verlag; 2000. p. 456-501.
- 3- ZUBER TJ. Rosacea. *Dermatology* 2000; 27: 309-318.
- 4- WILKIN JK. Rosacea. Pathophysiology and treatment. *Arch Dermatol* 1994;130: 359-62.
- 5- BAMFORD JT. Rosacea: current thoughts on origin. *Semin Cutan Med Surg* 2001;20:199-206.
- 6- AGREN MS. Gelatinase activity during wound healing. *Br J Dermatol* 1994; 131: 634-40.
- 7- 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: 1167-77.
- 8- PAQUET P, NUSGENS BV, PIÉRARD GE, LAPIÈRE M. Gelatinases in drug-induced toxic epidermal necrolysis. *Eur J Clin Invest* 1998; 28:528-32.
- 9- WINBERG JO, GEDDE-DAHL T Jr. Epidermolysis Bullosa Simplex: expression of gelatinase activity in cultured human skin fibroblasts. *Biochem Genet* 1992; 30: 401-20.
- 10- HUJANEN E, VÄISÄNEN A, ZHENG A, TRYGGVASON K, TURPENIEMI-HUJANEN. Modulation of M<sub>r</sub> 72,000 and M<sub>r</sub> 92,000 type-IV collagenase (gelatinase A

e B) gene expression by interferons alpha and gamma in human melanoma. *In J Cancer* 1994;58:582-86.

11- OORD JJ, PAEMEN L, OPDENAKKER, 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: 665-70.

12- NEUMANN E, FRITZ A. Capillaropathy and capillaroneogenesis in the pathogenesis of rosacea. *Int J Dermatol* 1998;37:263-6.

13- BERMANN H. A re-evaluation of the rosacea complex. *Am J Med Sci* 1956;232:458-73.

14- BERSAQUES J. Historical notes on (acne) rosacea. *Eur J Dermatol* 1995;5:16-22.

15- ROLLESTON JD. A note on the early history of rosacea. *Proc R S Med* 1932;1:327-9.

16- LYONS AS. GREECE and ROME. In: RAWLS W, editor. *Medicine: An Illustrated History*. New York: Abradale; 1978. p. 251-61.

17- CURRIER CG. Diseases of the Skin. In: KING ML, BURR B, editors. *Compendium of Domestic Medical Practice*. New York: Thomas Kelly; 1886 p. 744-822.

18- MCKENNA RMB. Rosacea. *Practitioner* 1958;180:533-42.

19- REBORA A. Rosacea. *J Invest Dermatol* 1987 88; Suppl 1:56-60.

20- MARKS R. Rosacea, flushing and perioral dermatitis. In: CHAMPION RH, BURTON JL, EBLING FJG, editors. *Textbook of Dermatology*. 5<sup>th</sup> ed. Oxford: Blackwell; 1992. p. 1885-63.

21- THIBOUTOT DM. Acne Rosacea. *Am Fam Physician* 1994;50:1691-7.

22- WILKIN J, DAHL M, DETMAR M, DRAKE L, FEINSTEIN A, ODOM R, POWELL F. Standard classification of rosacea: report of the National Rosacea

Society expert committee on the classification and staging of rosacea. *J Am Acad Dermatol* 2002;46:584-7.

23- SOBYE P. Aetiology and pathogenesis of rosacea. *Acta Dermatol Venereol* 1950;30:137-58.

24- BERG M, LIDÉN S. An epidemiological study of rosacea. *Acta Dermatol Venereol* 1989;69:419-23.

25- BONAMIGO RR, LEITE CS, WAGNER M, BAKOS L. Rosacea and *Helicobacter pylori*: interference of systemic antibiotic in the study of possible association. *J Eur Acad Dermatol* 2000;14:424-425.

26- MERCHÁN MMD. Rosacea. In: MARTIN JP, editor. Acne: Manejo Racional. 2<sup>nd</sup> ed. Bogotá: Colegio Ibero-latinoamericano de Dermatología; 1995. p. 115-22.

27- JANSEN T, PLEWIG G. Rosacea: classification and treatment. *J R Soc Med* 1997;90:140-50.

28- ROSEN T, STONE MS. Acne rosacea in blacks. *J Am Acad Dermatol* 1987;17:70-3.

29- SOBRIN L, LIU Z, MONROY DC, SOLOMON A, SELZER MG, LOKESHHHWAR BL, PLUGFELDER. Regulation of MMP-9 activity in human tear fluid end corneal epithelial culture supernatant. *Inv Ophtalmo Vis Science* 2000;41:1703-09.

30- FITZPATRICK TB, ORTONNE J-P. Normal skin color and general considerations of pigmentary disorders. In: FREEDBERG IM, EISEN AZ, WOLFF K, AUSTEN KF, GOLDSMITH LA, KATZ SI editors. Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine. 6<sup>th</sup> edition. New York: McGraw-Hill 2003; p.819-836.

31- WILKIN JK. Vasodilator rosacea. *Arch Dermatol* 1980;116:598.

32- DORNELLES SIT. Determinação da dose eritematosa mínima como marcador de risco e sensibilidade à radiação ultravioleta. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Pós-



Graduação em Medicina: Clínica Médica e Ciências Médicas. Porto Alegre 2001, p.1-115.

33- LEVER WF, SCHAUMBURG-LEVER G. Doenças inflamatórias dos apêndices epidérmicos e da cartilagem. In: LEVER WF, SCHAUMBURG-LEVER G, editors. *Histopatologia da Pele*. 7ª ed. São Paulo: Manole, 1991. p. 198-209.

34- WILKIN JK. Rosacea. *Int J Dermatol* 1983;22:393-400.

35- WILKIN JK. Flushing reactions: consequences and mechanisms. *Ann Intern Med* 1981;95:468-76.

36- WILKIN JK. Heat, not caffeine, induces flushing in erythematotelangiectatic rosacea [abstract]. *J Invest Dermatol* 1979;73:310.

37- BREATHNACH SM. Drug eruption. In: CHAMPION RH, BURTON JL, BURNS DA, BREATHNACH SM, editors. *Rook/Wilkinson/Ebling Textbook of Dermatology*. 6th ed. Oxford: Blackwell Science; 1998. p.3349-3517.

38- HOOVER WD, LANG PG. Pruritus in HIV infection. *J Am Acad Dermatol* 1991;6:1020-1.

39- REICHERT S, TRUCHETET F, CUNY JF, GRANDIDIER M. Tumeur carcinoïde a révélation cutanée. *Ann Dermatol Venerol* 1994;121:485-8.

40- CREAMER JD, WHITTAKER, SJ, GRIFFITHS WAD. Multiple endocrine neoplasia type 1 presenting as rosacea. *Clin Exp Dermatol* 1996;21:170-1.

41- REBORA A, DRAGO F, PICCIOTTO A. *Helicobacter pylori* in patients with rosacea. *Am J Gastroenterol* 1994;89:1603-4.

42- KOLIBÁSOVÁ K. Eradication of *Helicobacter pylori* as the only successful treatment in rosacea. *Arch Dermatol* 1996;132:1393.

43- CONRAD Jr AH, KENAMORE BD, LONERGAN WM. Results of gastroscopic examinations in patients with acne rosacea. *South Med J* 1950;43:631-3.

- 44- KOCH AE, POLVERINI PJ, KUNKEL SL, HARLOW LA, DI PIETRO LA, ELNER VM, *et al.* Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. *Science* 1992;258:1798-801.
- 45- LOGAN A. Angiogenesis. *Lancet* 1993;341:1467-8.
- 46- SZLACHCIC A, SLIWOWSKI Z, KARCZEWSKA E, BIELANSKI W, PYTKO-POLONCZYK J, KONTUREK SJ. *Helicobacter pylori* and its eradication in rosacea. *J Physiol Pharmacol* 1999;50:777-86.
- 47- BURNS DA. Follicle mites and their role in disease. *Clin Exp Dermatol* 1992;17:152-5.
- 48- SIBENGE S, GAWKRODGER DJ. Rosacea: a study of clinical patterns, blood flow, and the role of *Demodex folliculorum*. *J Am Acad Dermatol* 1992;26:590-3.
- 49- EL SHAZLY AM, GHANEUM BM, MORSY TA, AATY HEA. The pathogenesis of *Demodex folliculorum* (hair follicular mites) in female with and without rosacea. *J Egypt Soc Parasitol* 2001;31:867-75.
- 50- GEORGALA S, KATOULIS AC, KYLAFIS GD, KOUMANTAKI-MATHIOUDAKI E, ARONI K. *Demodex folliculorum* in papulopustular rosacea. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2001;15:441-44.
- 51- MARKS R. Concepts in the pathogenesis of rosacea. *Br J Dermatol* 1968;80:170-7.
- 52- BRINNEL H, FRIEDEL J, CAPUTA M, CABANAC M, GROSSHANS E. Rosacea: disturbed defense against brain overheating. *Arch Dermatol Res* 1989;281:66-72.
- 53- GUARRERA M, PARODI A, CIPRIANI C, DIVANO C, REBORA A. Flushing in rosacea: a possible mechanism. *Arch Dermatol Res* 1982;272:311-6.
- 54- RAMELET AA. Rosacea: a reaction pattern associated with ocular lesions and migraine? *Arch Dermatol* 1994;130:1448.

- 55- HOLLOWAY Jr GA, WATKINS DW. Laser doppler measurement of cutaneous blood flow. *J Invest Dermatol* 1977;69:306-9.
- 56- WILKIN JK. A quantitative, non-invasive method for the characterization of flushing reactions. *J Invest Dermatol* 1982;78:276-9.
- 57- PENNEYS NS. Factor XIII expression in the skin: observations and a hypothesis. *J Am Acad Dermatol* 1990;22:484-8.
- 58- DE LA FAILLE HB, DE LA FAILLE-KUYPER EHB. Immunofluorescent studies of the skin in rosacea. *Dermatologica* 1969;139:49-54.
- 59- SALO OP. SLE-like deposition of immunoglobulins in the skin in rosacea. *Ann Clin Res* 1970;2:28-31.
- 60- ABELL E, BLACK MM, MARKS R. Immunoglobulin and complement deposits in the skin in inflammatory facial dermatoses - an immunofluorescence study. *Br J Dermatol* 1974;91:281-86.
- 61- NUNZI E, REBORA A, HAMERLINCK F, CORMANE RH. Immunopathological studies on rosacea. *Br J Dermatol* 1980;103:543-51.
- 62- MANNA V, MARKS R, HOLT P. Involvement of immune mechanisms in the pathogenesis of rosacea. *Br J Dermatol* 1982;107:203-8.
- 63- POWELL FC, CORBALLY N, POWELL D. Substance P levels in rosacea. In: Acne and related disorders. Proceedings of an International Symposium. Cardiff 1998, Marks R, Plewig G, editors. Martin Dunitz: London, pp 307-310 *apud* Wollina U. Rhinophyma-unusual expression of simple-type keratins and S100A and abundance of VIP receptor-positive dermal cells. *Histol Histopathol* 1996;11:111-15.
- 64- KÜRKÇÜOĞLU N, ALAYBEYI. Substance P immunoreactivity in rosacea. *J Am Acad Dermatol* 1991;25:725-26.
- 65- WOLLINA U. Rhinophyma-unusual expression of simple-type keratins and S100A and abundance of VIP receptor-positive dermal cells. *Histol Histopathol* 1996; 11: 111-15.

- 66- TOPE WD, SANGUEZA OP. Rhinophyma's fibrous variant. Histopathology and Immunohistochemistry. *Am J Dermatopathol* 1994;16:307-10.
- 67- ALOI F, TOMASINI C, SORO E, PIPPIONE M. The clinicopathologic spectrum of rhinophyma. *J Am Acad Dermatol* 2000;42:468-72.
- 68- BARTON K, MONROY DC, NAVA A, PFLUGFELDER SC. Inflammatory cytokines in the tears of patient with ocular rosacea. *Ophthalmology* 1997;104:1868-74.
- 69- BARTON K, MONROY DC, NAVA A, PFLUGFELDER SC. Cytokines and tear function in ocular surface disease. *Adv Exp Med Biol* 1998;438:461-9.
- 70- AFONSO AA, SOBRIN L, MONROY DC, SELZER M, LOKESSHAWAR B, PFLUGFELDER SC. Tear fluid gelatinase B activity correlates with IL-1 alpha concentration and fluorescein clearance in ocular rosacea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40: 2506-12.
- 71- KIRATLI H, IRKEÇ M, ORHAN M. Tear lactoferrin in chronic meibomitis associated with acne rosacea. *Eur J Ophthalmol*;10:11-14.
- 72- BAMFORD JTM. Rosacea: current thoughts on origin. *Sem Cutan Med Surg* 2001; 20: 199-206.
- 73- UTAS S, ÖZBAKIR Ö, TURUSAN A, UTAS C. *Helicobacter pylori* eradication treatment reduces the severity of rosacea. *J Am Acad Dermatol* 1999;40:433-5.
- 74- SCHNEIDER MA, SKINNER Jr RB, ROSENBERG EW, NOAH PW, SMITH L, ZWARUM A. Serological determination of *Helicobacter pylori* in rosacea patients and controls (abstract). *Clin Res* 1992,40:831A.
- 75- JONES MP, KNABLE Jr AL, WHITE MJ, DIRNING SJ. *Helicobacter pylori* in rosacea: lack of an association. *Arch Dermatol* 1998;134:511.
- 76- SHARMA VK, LYNN A, KAMINSKI M, VASUDEVA R, HOWDEN CW. A study of the prevalence of *Helicobacter pylori* and others markers of upper gastrointestinal tract disease in patient with rosacea. *Am J Gastroenterol* 1998;93:220-22.

- 77- DUPONT C. How common is extrafacial rosacea? *J Am Acad Dermatol* 1986;14: 839.
- 78- HABIF TP. Acne, Rosacea and Related Disorders. In: *Clinical Dermatology. A Color Guide to Diagnosis and Therapy*. 3. ed. St. Louis: Mosby; 1996. p. 148-89.
- 79- HELM KF, MENZ J, GIBSON LE, DICKEN CH. A clinical and histopathologic study of granulomatous rosacea. *J Am Acad Dermatol* 1991;25:1038-43.
- 80- CUNLIFFE WJ, ROWELL NR. Pyoderma faciale. *J Am Acad Dermatol* 1982;6:84-91.
- 81- JUGOVÁ E, SEMRADOVÁ V. *Rosacea fulminans*. *Ceskoslov Dermatol* 2000;75:71-4.
- 82- MARKS R, HARCOURT-WEBSTER JN. Histopathology of rosacea. *Arch Dermatol* 1969;100:683-91.
- 83- RHODES LE, PARSLEW RAG, ASHWORTH J. Outcome of facial rashes with non-specific histological features: a long term follow-up of 64 cases. *J Cutan Pathol* 1995;22:160-63.
- 84- RUFLI T, BÜCHNER SA. T-Cell Subsets in acne rosacea lesions and the possible role of *Demodex folliculorum*. *Dermatologica* 1984;169:1-5.
- 85- PLEWIG G, JANSEN T. Rosacea. In: FREEDBERG IM, EISEN AZ, WOLFF K, AUSTEN KF, GOLDSMITH LA, KATZ SI, FITZPATRICK TB, editors. *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine*. 5<sup>th</sup> ed. New York: McGraw-Hill; 1999 p.785-94.
- 86- LEVER WF, SCHAUMBURG-LEVER G. Doenças do tecido conjuntivo. In: LEVER WF, SCHAUMBURG-LEVER G. *Histopatologia da Pele*. 7. ed. São Paulo: Manole, 1991. p. 449-75.
- 87- VASSILEVA S. Lupus erithematosus. In: KANITAKIS J, VASSILEVA S, WOODLEY D, editors. *Diagnostic Immunohistochemistry of the Skin*. London: Chapman & Hall; 1998. p. 144-56.

- 88- ODOM RB, JAMES WD, BERGER TG. Acne. In: ODOM RB, JAMES WD, BERGER TG, editors. *Andrews' Diseases of the skin: clinical dermatology*. 9<sup>th</sup> ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 2000 p.284-306.
- 89- MENTZEL T, KUTZNER H, WOLLINA U. Cutaneous angiosarcoma of the face: clinicopathologic and immunohistochemical study of case resembling rosacea clinically. *J Am Acad Dermatol* 1998;38:837-40.
- 90- COHEN CG, KRAHN L, WISE TN, EPSTEIN S, ROSS R. Desilusions of disfigurement in a woman with acne rosacea. *Gen Hosp Psychiatry* 1991; 13:273-7.
- 91- VAN LANDUYT H, JOUBERT-LEQUAIN I, HUMBERT P, LUCAS A, DROBACHEFF C, MERCIER M, LAURENT R. Treatment of rosacea. Clonidine (0.075 mg per day) versus placebo (initial results). *Ann Dermatol Venereol* 1997; 124:729.
- 92- GROSSHANS E, MICHEL C, ARCADE B, CRIBIER B. rilmenidine in rosacea: a double-blind versus placebo. *Ann Dermatol Venereol* 1997; 124:687-91.
- 93- WOLLINA U. The response of erythematous rosacea to ondansetron. *Br J Dermatol* 1999; 140:561-2.
- 94- NIELSEN PG. A double-blind study of 1% metronidazole cream versus systemic oxytetracycline therapy for rosacea. *Br J Dermatol* 1983; 109:63-5.
- 95- SAIHAN EM, BURTON JL. A double-blind trial of metronidazole versus oxytetracycline therapy for rosacea. *Br J Dermatol* 1980; 102:443-5.
- 96- QUATERMAN MJ, JOHNSON DW, ABELE DC, LESHNER JL, HULL DS, DAVIS LS. Ocular rosacea. Signs, symptoms, and tear studies before and after treatment with doxycycline. *Arch Dermatol* 1997; 133:89-90.
- 97- TORRESANI C, PAVESI A, MANARA GC. Clarithromycin versus doxycycline in the treatment of rosacea. *Int J Dermatol* 1997; 36:942-6.
- 98- REBORA A. The management of rosacea. *Am J Clin Dermatol* 2002; 3:489-96.

- 99- WILKIN JK, DEWITT S. Treatment of rosacea: topical clindamycin versus oral tetracycline. *Int J Dermatol* 1993; 32:65-7.
- 100- MADDIN S. A comparison of topical azelaic acid 20% cream and topical metronidazol 0.75% cream in the treatment of patient with papulopustular rosacea. *J Am Acad Dermatol* 1999; 40:961-5.
- 101- SIGNORE RJ. A pilot study of 5 percent permethrin cream versus 0,75 percent metronidazole gel in acne rosacea. *Cutis* 1995; 53:177-9.
- 102- ERTL GA, LEVINE N, KLIGMAN AM. A comparison of the efficacy of topical tretinoin and low-dose oral isotretinoin in rosacea. *Arch Dermatol* 1994; 130:319-24.
- 103- MILLS OH Jr, KLIGMAN AM. Topically applied erythromycin in rosacea. *Arch Dermatol* 1976; 112:553.
- 104- ARONSON IK, RUMSFIELD JA, WEST DP, ALEXANDER J, FISCHER JH, PALOUCZEK FP. Evaluation of topical metronidazole gel in acne rosacea. *Drug Intell Clin Pharm* 1987; 21:346-51.
- 105- BLEICHER PA, CHARLES JH, SOBER AJ. Topical metronidazole therapy for rosacea. *Arch Dermatol* 1987; 123:609-14.
- 106- ESPAGNE E, GUILLAUME JC, ARCHIMBAUD A, BASPEVRAS M, BOITIER F, BUSSIÈR R, *et al.* Double-blind study versus excipient of 0,75% metronidazole gel in the treatment of rosacea. *Ann Dermatol Venereol* 1993; 120:129-33.
- 107- BRENEMAN DL, STEWART D; HEVIA O, HINO PD, DRAKE LA. A double-blind multicenter clinical trial comparing efficacy of once-daily metronidazole 1 percent cream to vehicle in patient with rosacea. *Cutis* 1998; 61:44-7.
- 108- DAHL MV, JARRATT M, KAPLAN D, TULEY MR, BAKER MD. Once-daily topical metronidazole cream formulations in the treatment of the papulas and pustules of rosacea. *J Am Acad Dermatol* 2001; 45:723-30.
- 109- KRAUSE MH, TORRICELLI R, KÜNDIG T, TRÜEB RM, HAFNER J. Dapsone in granulomatous rosacea. *Hautarzt* 1997; 48:246-8.

- 110- HOTING E, PAUL E, PLEWIG G. Treatment of rosacea with isotretinoin. *Int J Dermatol* 1986; 25: 660-3.
- 111- DAHL MV, KATZ HI, KRUEGER GG, MILIKAN LE, ODOM RB, PARKER F, *et al*. Topical metronidazole maintains remissions of rosacea. *Arch Dermatol* 1998; 134:679-83.
- 112- CLARK SM, LANIGAN SW, MARKS R. Laser treatment of erythema and telangiectasia associated with rosacea. *Lasers Med Sci* 2002; 17:26-33.
- 113- WEST TB, ALSTER TS. Comparison of the long-pulse dye (590-595 nm) and KTP (532 nm) lasers in the treatment of facial and leg telangiectasias. *Dermatol Surg* 1998; 24:221-6.
- 114- LOMEIO P, MCDONALD J, FINNEMAN J. Rhinophyma: treatment with CO<sub>2</sub> laser. *Ear Nose Throat J* 1997; 76:740-3.
- 115- SIMO R, SHARMA VL. Treatment of rhinophyma with carbon dioxide laser. *J Laryngol Otol* 1996; 841-6.
- 116- WOLF JE. Medication adherence: a key factor in effective management of rosacea. *Adv Ther* 2001; 18:272-81.
- 117- IRVINE C, MARKS R. Prognosis and prognostic factors in rosacea. In: Marks R, Plewig G, editors. Acne and related disorders. Proceedings of an International Symposium. *Cardiff* 1988; 331-333.
- 118- ALVAREZ NR, DONOSO RR, HERRERA MI. Análisis retrospectivo de los factores de riesgo de rechazo y mala agudeza visual en transplante de córnea. *Arc Chil Oftal* 1989;46:245-8.
- 119- SAMPAIO S, RIVITTI E. Anatomia e Fisiologia. In: SAMPAIO S, RIVITTI E, editors. *Dermatologia*. São Paulo: Artes Médicas, 1998 p. 3-35.
- 120- POPE FM. Dermis. In: CHAMPION RH, BURTON JL, BURNS DA, BREATHNACH SM, editors. *Textbook of Dermatology*. 6 ed. Oxford: Blackwell Science; 1998. p.59-92.



- 121- UITTO J, PULKKINEN L, CHU ML. Collagen. In: FREEDBERG IM, EISEN AZ, WOLFF K, AUSTEN KF, GOLDSMITH LA, KATZ SI, editors. *Dermatology in General Medicine*. 6<sup>th</sup> ed. New York: McGraw-Hill, 2003. p. 165-79.
- 122- UITTO J, CHU M-I. Elastic Fibers. In: FREEDBERG IM, EISEN AZ, WOLFF K, AUSTEN KF, GOLDSMITH LA, KATZ S, editors. *Dermatology in General Medicine*. 6<sup>th</sup> ed. New York: McGraw-Hill, 2003. p. 180-9.
- 123- GALLO RL. Proteoglycans and Glycosaminoglycans of Skin. In: FREEDBERG IM, EISEN AZ, WOLFF K, AUSTEN KF, GOLDSMITH LA, KATZ S FITZPATRICK TB, editors. *Dermatology in General Medicine*. 5<sup>th</sup> ed. New York: McGraw-Hill, 1999. p. 283-8.
- 124- EADY RAJ, LEIGH IM, POPE FM. Anatomy and Organization of Human Skin. In: CHAMPION RH, BURTON JL, BURNS DA, BREATHNACH SM, editors. *Textbook of Dermatology*. 6<sup>th</sup> ed. Oxford: Blackwell Science; 1998. p. 37-111.
- 125- OPDENAKKER G, VAN DAMME J. Cytokines and proteases in invasive processes: molecular similarities between inflammation and cancer. *Cytokine* 1992;4:251-8.
- 126- SANG QX, JIA MC, SCHWARTZ MA, JAYE MC, KLEINMAN HK, GHAFARI MA, LUO YL. New thiol and sulfodiimine metalloproteinase inhibitors and their effect on microvascular endothelial cell growth. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;274:780-6.
- 127- 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 S, editors. *Dermatology in General Medicine*. 6<sup>th</sup> ed. New York: McGraw-Hill, 2003 p. 200-209.
- 128- FIGUEIREDO E, DUQUE-MAGALHÃES MC. Identification, purification and partial characterization of a carboxypeptidase from the matrix of rat liver mitochondria: a novel metalloenzyme. *Biochem J* 1994;300:15-19.

- 129- RITTNER HL, KAISER M, BRACK A, SZWEDA LI, GORONZY JJ, WEYAND CM. Tissue-destructive macrophages in giant cell arteritis. *Circ Res* 1999;84:1050-8.
- 130- WENK J, BRENNEISEN P, WLASCHEK M, POSWING A, BRIVIBA K, OBERLEY TD, SCARFFETER-KOCHANNEK K. Stable overexpression of manganese superoxide dismutase in mitochondria identifies hydrogen peroxide as a major oxidant in the AP-1-mediated induction of matrix-degrading metalloproteinase-1. *J Biol Chem* 1999;274:25869-76.
- 131- GARBUZENKO E, NAGLER A, PICKHOLTZ D, GILLERY P, REICH R, MAQUART FX, LEVI-SCHAFFER F. Human mast cells stimulates fibroblast proliferation, collagen synthesis and lattice contraction: a direct role for mast cells in skin fibrosis. *Clin Exp Allergy* 2002;32:237-46.
- 132- GÓMEZ DE, ALONSO DF, YOSHIJI H, THORGEIRSSON UP. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol* 1997;74:111-22.
- 133- TAGAKI M, SANTAVIRTA S, IDA H, ISHII M, AKIMOTO K, SAOTOMA K, *et al.* The membrane-type-matrix metalloproteinase/matrix metalloproteinase-2/tissue inhibitor of metalloproteinase-2 system in periprosthetic connective-tissue remodeling in loose total-hip prostheses. *Lab Invest* 1998;78:735-42.
- 134- ROEB E, SCHLEINKOGEN K, KERNEBECK T, PÖTSCH S, JANSEN B, BEHRMENN I, *et al.* The matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) hemopexin domain is a novel gelatin binding domain and acts as an antagonist. *J Biol Chem* 2002;277:50326-32.
- 135- O'FARRELL, POURMOTATBED T. The fibronectin-like domain is required for the type V and XI collagenolytic activity of gelatinase B. *Arch Biochem Biophys* 1998;354:24-30.

- 136- PENDAS AM, MATILLA T, ESTIVILL X, LÓPEZ-OTÍN C. The human collagenase-3 (CLG-3) gene is located on chromosome 11q22.3 clustered to other members of the matrix metalloproteinase gene family. *Genomics* 1995;10: 615.
- 137- COLLIER IE, BRUNS GA, GOLDBERG GI, GERHARD DS. On the structure and chromosome location of the 72- and 92-kDa human type IV collagenase genes. *Genomics* 1991;9: 429-34.
- 138- RAZA SL, CORNELIUS LA. Matrix metalloproteinases: pro- and anti-angiogenic activities. *J Invest Dermatol Symp Proc* 2000;5:47-54.
- 139- WONG WR, KOSSODO S, KOICHEVAR IE. Influence of cytokines on matrix metalloproteinases produced by fibroblasts cultured in monolayer and collagen gels. *J Formos Med Assoc* 2001;100:377-82.
- 140- KANBE N, TANAKA A, KANBE M, ITAKURA A, KUROSAWA M, MATSUDA H. Human mast cells produce matrix metalloproteinase 9. *Eur J Immunol* 1999;29:2645-9.
- 141- LI L, AKERS K, EISEN A, SELTZER JL. Activation of gelatinase A (72-kDa collagenase) induced by monensin in normal human fibroblasts. *Exp Cell Res* 1997;232: 322-30.
- 142- OLERUD JE, USUI ML, SECKIN D, CHIU DS, HAYLOR CL, SONG IS, ANSEL JC, BUNNET NW. Neutral endopeptidase expression and distribution in human skin and wounds. *J Invest Dermatol* 1999;112:873-81
- 143- WU J, AKAIKE T, HAYASHIDA K, OKAMOTO A, MAEDA H. Enhanced vascular permeability in solid tumor involving peroxynitrite and matrix metalloproteinases. *Jpn J Cancer Res* 2001; 92:439-51.
- 144- MAEDA A, SOBEL RA. Matrix metalloproteinases in the normal human central nervous system, microglial nodules, and multiple sclerosis lesions. *J Neuropathol Exp Neurol* 1996;55: 300-09.

- 145- HUGES PM, WELLS GMA, CLEMENTS JM, GEARING JH, REDFORD EJ, DAVIES M *et al.* Matrix metalloproteinase expression during experimental autoimmune neuritis. *Brain* 1998;121: 481-94.
- 146- RYAN ME, USMAN A, RAMAMURTHY NS, GOLUB LM, GREENWALD RA. Excessive matrix metalloproteinase activity in diabetes: inhibition by tetracycline analogues with zinc reactivity. *Curr Med Chem* 2001;8:305-16.
- 147- SAMPAIO EP. Metaloproteinases e citocinas: correlação com as formas clínicas de hanseníase. Congresso Brasileiro de Patologia, 24<sup>o</sup>, 2003, Florianópolis. Anais do Congresso, 2003.
- 148- SELTZER JL, ADAMS AS, GRANT GA, EISEN AZ. Purification and properties of a gelatin-specific neutral protease from human skin. *J Sci Biol Chem* 1981;256: 4662-8.
- 149- COLLIER IE, WILHELM SM, EISEN AZ, MARMER BL, GRANT GA, SELTZER JL, KRONBERGER A, HE CS, BAUER EA, GOLDBERG GT. H-ras oncogen-transformed human bronchial epithelial cells (TBE-1) secrete a single metalloproteinase capable of degrading basement membrane collagen. *J Biol Chem* 1988;263:6579-87.
- 150- HAN YP, TUAN TL, WU H, HUGES M, GARNER WL. TNF-alpha stimulates activation of pro-MMP-2 in human skin through NF-(kappa) B mediated induction of MT1-MMP. *J Cell Sci* 2001; 114:131-39.
- 151- RUANGPANIT N, CHAN D, HOLMBECK K, BIRKEDAL-HANSEN H, POLAREK J, YANG C, BATEMAN JF, THOMPSON EW. Gelatinase A (MMP-2) activation by skin fibroblasts: dependence on MT1-MMP expression and fibrillar collagen form. *Matrix Biol* 2001;20:193-203.
- 152- ZIGRINO P, DRESCHER C, MAUCH C. Collagen-induced proMMP-2 activation by MT1-MMP in human dermal fibroblasts and the possible role of alpha2beta1 integrins. *Eur J Cell Biol* 2001;80:68-77.

- 153- RUANGPANIT N, PRICE JT, HOLMBECK K, BIRKEDAL-HANSEN H, GUENZLER V, HUANG X, BATEMAN JF, THOMPSON EW. MT1-MMP-dependent and -independent regulation of gelatinase A activation in long-term, ascorbate-treated fibroblast cultures: regulation by fibrillar collagen. *Exp Cell Res* 2002;272:109-18.
- 154- ISHIBASHI Y, ITO H, SEYAMA, KUBOTA S. Anti-alpha2 integrin antibody induces secretion and activation of 72-kDa progelatinase by human fibroblasts. *IUBMB Life* 2001;51:25-31.
- 155- WILHEM SM, COLLIER IE, KRONBERGER A, EISEN AZ, MARMER BL, GRANT GA, BAUER EA, GOLDBERG GI. Human skin fibroblast stromelysin: structure, glycosylation, substrate specificity, and differential expression in normal and tumorigenic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:6725-9.
- 156- HAN YP, TUAN TL, HUGES M, GARNER WL. Transforming growth factor-beta and tumor necrosis factor-alpha-mediated induction and proteolytic activation of MMP-9 human skin. *J Biol Chem* 2001;276:22341-50.
- 157- SUGITA Y, MORITA E, TANAKA T, NAKAMURA K, YAMAMOTO S. Production of tissue inhibitor of metalloproteinase -1 and -2 by cultured keratinocytes. *J Dermatol Sci* 2000;22:107-16.
- 158- AMBILI M, SUDHAKARAN PR. Modulation of neutral matrix metalloproteinases of involuting rat mammary gland different cations and glycosaminoglycans. *J Cell Biochem* 1999;73:218-26.
- 159- STEPHENS P, DAVIES KJ, OCCLESTON N, PLEASS RD, KON C, DANIELS J, KHAW PT, THOMAS DW. Skin and oral fibroblasts exhibit phenotypic differences in extracellular matrix reorganization and matrix metalloproteinase activity. *Br J Dermatol* 2001;144:229-37.
- 160- SANSILVESTRI-MOREL P, RUPIN A, JAISSON S, FABIANI JN, VERBEUREN TJ, VANHOUTTE PM. Synthesis of collagen is dysregulated in cultured fibroblasts

derived from skin of subjects with varicose veins as it is in venous smooth muscle cells. *Circulation* 2002;106:479-83.

161- HITCHON CA, DANNING CL, III EI GG, EI-GABALAWY HS, BOUMPAS DT. Gelatinase expression and activity in the synovium and skin of patient with erosive psoriatic arthritis. *J Rheumatol* 2002;29:107-17.

162- FAKHOURY H, HILLARBY MC, WEISS JB. Increased gelatinase activity in systemic sclerosis dermal fibroblast cultures with unaltered gelatinase A mRNA expression. *J Dermatol Sci* 2002;29:62-9.

163- DZIANKOWSKA-BARTKOWIAK B, WASZCZYKOWSKA E, LUCZYNSKA M, ZALEWSKA, SYSA-JEDRZEJOWSKA A. Serum levels of tissue inhibitor of metalloproteinases 2 in systemic sclerosis: a preliminar study. *Med Sci Monit* 2002;8:CR108-12.

164- BROWN PD, BLOXIDGE RE, STUART NSA, GATTER KC, CARMICHAEL J. Association Between expression of Activated 72-Kilodalton Gelatinase and Tumor Spread in Non-Small Cell Lung Carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1993;85:574-8.

165- PERIDES G, TANNER-BROWN LM, ESKILDSEN MA, KLEMPNER MS. *Borrelia burgdoferi* induces matrix metalloproteinases by neural cultures. *J Neurosci Res* 1999;58:779-90.

166- MORY N, SATO H, HAYASHIBARA T, SENBA M, GELAZIUNAS C, WADA A, HIROYAMA T, YAMAMOTO N. *Helicobacter pylori* induces matrix metalloproteinase-9 through activation of nuclear factor kappa B. *Gastroenterol* 2003;124:983-92.

167- TOMINAGA M, MIGITA K, NAKAMURA H, ICHINOSE Y, FURUYA T, ORIGUCHI T, KAWABE Y, HIDA A, NAKAMURA T, EGUCHI K. Expression of metalloproteinase-2 (gelatinase A) in labial salivary glands of patients with Sjögren syndrome with HTLV-1 infection. *Clin Exp Rheumatol* 1999;17:463-6.

168- HOFMANN A, LAUE S, ROST AK, SCHERBAUM WA, AUST G. mRNA levels membrane-type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP), MMP-2, and MMP-9 and of

their inhibitors TIMP-2 and TIMP-3 in normal thyrocytes and thyroid carcinoma cell lines. *Thyroid* 1998;8:203-14.

169- FELICIANI C, VITULLO P, D'ORAZI G, PALMIRITTA R, AMERIO P, MOHAMMAD PS *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: 321-7.

170- SUOMELA S, KARINIEMI AL, SNELLMAN E, SAARIALHO-KERE U. Metalloelastase (MMP-12) and 92-kDa gelatinase (MMP-9) as well as their inhibitors, TIPM-1 and -3 are expressed in psoriatic lesions. *Exp Dermatol* 2001;10:175-83.

171- GIANNELLI G, BRASSARD J, FOTI C, STLETER-STEVENSON WG, FALK-MARZILLIER J, ZAMBONIN-ZALONE A *et al.* Altered Expression of Basement Membrane Proteins and Their Integrins Receptors in Lichen Planus: Possible Pathogenetic Role of Gelatinases A and B. *Laboratory Inv* 1996;74: 1091-1104.

172- VENENCIE PY, BONNEFOY A, GOGLY B, KUT C, PELLAT B, HORNEBECK W *et al.* Increased expression of gelatinases A and B skin explants from patients with anetoderma. *Br J Dermatol* 1997;137:517-25.

173- GHOMRASSENI S, DRIDI M, GOGLY B, BONNEFOIX M, VABRES P, VENECIE PY *et al.* Anetoderma: na altered balance between metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases. *Am J Dermatopathol* 2002;24:118-29.

174- HEROUY Y, MELLIOS P, DICHMANN S, NOCKOWSKI P, SCHÖPF E, NORGAUER J. Inflammation in stasis dermatitis upregulates MMP-1, MMP-2 and MMP-13 expression. *J Dermatol Sci* 2001;25:198-205.

175- BULLEN EC, LONGAKER MT, UPDIKE DL, BENTON R, LADIN D, Hou Z *et al.* *J Inv Dermatol* 1995;104: 236-40.

176- YAGER DR, ZHANG LY, LIANG HX, DIEGELMANN RF, COHEN K. Wound fluids from human pressure ulcers contain elevated matrix metalloproteinase levels and activity compared to surgical wound fluids. *J Inv Dermatol* 1996;107: 743-8.

- 177- COOK H, DAVIES KJ, HARDING KG, THOMAS DW. Defective extracellular matrix reorganization by chronic wound fibroblasts is associated with alterations in TIMP-1, TIMP-2, MMP-2 activity. *J Invest Dermatol* 2000;115:225-33.
- 178- NEELY AN, CLENDENING CE, GARDNER J, GREENHALGH DG, WARDEN GD. Gelatinase activity in keloids and hypertrophic scars. *Wound Repair and Regeneration* 1999;7: 166-71.
- 179- TSUKIFUJI R, TAGAWA K, HATAMUCHI A, SHINKAI H. Expression of matrix metalloproteinase-1, -2, -3 in squamous cell carcinoma and actinic keratosis. *Br J Cancer* 1997;80:1087-91.
- 180- VARANI J, HATTORI Y, SCHMIDT T, PERONE P, ZEIGLER ME, FADER DJ, JOHNSON TM. Collagenolytic and gelatinolytic matrix metalloproteinases and their inhibitors in basal cell carcinoma of skin: comparison with normal skin. *Br J Cancer* 2000;82:657-65.
- 181- VÄISANEN A, TUOMINEN H, KALLIOINEN M, TURPEENIEMI-HUJANEN T. Matrix metalloproteinase-2 (72kDa type Iv collagenase) expression occurs in the early stage of human melanocytic tumour progression and may have prognostic value. *J Pathol* 1996;180:283-89.
- 182- 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;191:245-56.
- 183- BODEY B, BODEY B, SIEGAL SE, KAISER HE. Matrix metalloproteinase expression in malignant melanomas: tumor-extracellular matrix interactions in invasion and metastasis. *In Vivo* 2001;15:57-64.
- 184- WOLLINA U, HIPLER UC, KNÖLL B, GRAEFE T, KAATZ M, KIRSCH K. Serum metalloproteinase-2 patients with malignant melanoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2001;127:631-5.



- 185- 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;197:179-87.
- 186- MARTIN M, REMY J, DABURON F. Abnormal proliferation and aging of cultured fibroblasts from pigs with subcutaneous fibrosis induced by gamma irradiation. *J Invest Dermatol* 1989;93:497-501
- 187- WEGROWSKI J, REMY J, MARTIN M, LAFUMA C. Fibronectin and glycosaminoglycan synthesis by fibrotic pig fibroblasts in primary culture. *Connect Tissue Res* 1989;23:237-49.
- 188- LAFUMA C, EL NABOUT A, CRECHET F, HOVNANIAN A, MARTIN M. Expression of 72-kDa gelatinase (MMP-2), collagenase (MMP-1), and tissue metalloproteinase inhibitor (TIMP) in primary pig skin fibroblast cultures derived from radiation-induced skin fibrosis. *J Invest Dermatol* 1994;102:945-50.
- 189- KOIVUKANGAS V, KALLIOINEN M, AUTIO HH, OIKARINEN A. UV irradiation induces the expression of gelatinases in human skin in vivo. *Acta Derm Venereol* 1994;74:279-82.
- 190- 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 fibroblast in culture. *Cell Biol Int* 1997;21:347-52.
- 191- FISHER GJ, WANG Z, DATTA SC, VERANI J, KANG S, VOORHEES JJ. Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light. *N Eng J Med* 1997;337:1419-28.
- 192- PINNELL SR. Cutaneous photodamage, oxidative stress, and topical protection. *J Am Acad Dermatol* 2003;48:1-19.

- 193- GIANELLI G, FOTI C, MARINOSCI F, BONAMONTE D, ANTONACI S, ANGELINI G. Gelatinase expression at positive patch test reactions. *Contact Dermatitis* 2002;46:280-5.
- 194- YAZAWA N, KIKUCHI K, FUJIMOTO M, KUBO M, TAMAKI T, TAMAKI K. Serum levels of tissue inhibitor of metalloproteinases 2 in patients with systemic sclerosis. *J Am Acad Dermatol* 2000;42:70-5.
- 195- KIKUCHI K, KUBO M, HOASHI T, TAMAKI K. Decreased MMP-9 activity in the serum of patient with diffuse cutaneous systemic sclerosis. *Clin Exp Dermatol* 2002;27:301-5.
- 196- OHNISHI Y, ITO Y, TAJIMA S, ISHIBASHI A, ARAI K. Immunohistochemical study of membrane type-matrix metalloproteinases (MT-MMPs) and metalloproteinase-2 (MMP-2) in dermatofibroma and malignant fibrous histiocytoma. *J Dermatol Sci* 2002;28:119-25.
- 197- HEROURY Y, NOCKOWSKI P, SCHÖPF E, NORGAUER J. Lipodermatosclerosis and the significance of proteolytic remodeling in the pathogenesis of venous ulceration. *Int J Mol Med* 1999;3:511-5.
- 198- LÊ J, DAUCHOT P, PERROT JL, CAMBAZARD F, FREY J, CHAMSON A. Quantitative zymography of matrix metalloproteinases by measuring hydroxiperoline: application to gelatinases A and B. *Electrophoresis* 1999;20:2824-29.
- 199- LAMOREAUX WJ, FITZGERALD MEC, REINER A, HASTY KA, CHARLES ST. Vascular endothelial growth factor increase release of gelatinase A and decreases release of tissue inhibitor of metalloproteinases by microvascular endothelial cells *in vitro*. *Microvascular Res* 1998;55:29-42.
- 200- SOLOMON A, DURSUN D, LIU Z, XIE Y, MACRI A, PFLUGFELDER SC. Pro- and anti-inflammatory forms of interleukin-1 in the tear fluid and conjunctiva of patients with dry-eye disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42:2283-92.

- 201- NGUYEN M, ARKELL , JACKSON CJ. Active and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-free gelatinase B accumulates within human microvascular endothelial vesicles. *J Biol Chem* 1998;273:5400-04.
- 202- ASAI M, KATO M, ASAI N, IWASHITA T, MURAKAMI H, KAWAI K, NAKASHIMA I, TAKAHASHI M. Differential regulation of MMP-9 and TIMP-2 expression in malignant melanoma developed in metallothionein/RET transgenic mice. *Jpn J Cancer Res* 1999;90:86-92.
- 203- GEISLER S, LICHTINGHAGEN, BÖKER KHW, VEH RW. Differential distribution of five members of the matrix metalloproteinase family and one inhibitor (TIMP-1) in human liver and skin. *Cell Tissue Res* 1997;289:173-83.
- 204- THEWES M, WORET WI, ENGST R, RING J. Stromelysin-3 (ST-3): immunohistochemical characterization of the matrix metalloproteinase (MMP)-11 in benign and malignant skin tumours and other skin disorders. *Clin Exp Dermatol* 1999;24:122-6.
- 205- WALKER RA, WOOLEY DE. Immunolocalisation studies of matrix metalloproteinases -1, -2 and -3 in human melanoma. *Virchows Arch* 1999;435:574-9.
- 206- O'LEARY R, ARROWSMITH M, WOOD EJ. Characterization of the living skin equivalent as a model of cutaneous re-epithelialization. *Cell Biochem Funct* 2002;20:129-41.
- 207- 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; 11:420-3.
- 208- 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.

- 209- KAMARASHEV J. Immunohistochemical techniques for light microscopy. In: KANITAKIS J, VASSILEVA S, WOODLEY D, editors. Diagnostic immunochemistry of the skin. London: Chapman and Hall; 1998. p. 3-18.
- 210- BOORSMA DM, NIEBOER C, KALSBECK GL. Cutaneous immunohistochemistry. *J Cutaneous Pathol* 1975;2:294-301.
- 211- ROITT I, BROSTOFF J, MALE D. Immunological techniques. In: ROITT I, BROSTOFF J, MALE D, editors. Immunology. 5th ed. London: Mosby; 1998. p 381-395.
- 212- KANITAKIS J, VASSILEVA S, WOODLEY D. Diagnostic immunohistochemistry of the skin. Chapman and Hall: London; 1998.
- 213- BERANGER JY, GODEAU G, FRANCES C, ROBERT L, HORNEBECK W. Presence of gelatinase A and metalloelastase type protease at the plasma membrane of human skin fibroblasts. Influence of cytokines and growth factors on cell-associated metalloendopeptidase levels. *Cell Biol Int* 1994;18:715-22.
- 214- MAILLARD JL, FAVREAU C, REBOUD RM. Role of monocyte/macrophage derived matrix-metalloproteinases (gelatinases) in prolonged skin inflammation. *Clin Chim Acta* 1995;233:61-74.
- 215- AMANO S, AKUTSU N, NISHIMA T, CHAMPLIAUD MF, BURGESSON RE, ADACHI E. Importance of balance between matrix synthesis and degradation in basement membrane formation. *Exp Cell Res* 2001;271:249-62.
- 216- KESKI-OJA, LOHI J, TUUTTILA A, TRYGGUASON K, VARTIO T. Proteolytic processing of the 72.000-Da type IV collagenase by urokinase plasminogen activator. *Exp Cell Res* 1992;202:471-6.

## 5. ARTIGOS APRESENTADOS ÀS REVISTAS

### 5.1. Artigo 1: Immunohistochemical expression of matrix metalloproteinases-2 and -9 in rosacea: a case-control study.

#### Authors

Renan Rangel Bonamigo, Lucio Bakos, Maria Isabel Albano Edelweiss, André Cartell.

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

#### Correspondence

Renan Rangel Bonamigo – Rua Dr. Vale 605 / 401B, CEP 90560-010, Porto Alegre, RS, Brazil. Phone:+55.51.33467209; Fax:+55.51.33467209; e-mail: [rbona@portoweb.com.br](mailto:rbona@portoweb.com.br)

## Abstract

**Background:** rosacea has important stages and variants, with an inflammatory component. Many aspects of the rosacea pathogenesis are still under discussion, and the matrix metalloproteinases (MMPs) are enzymes that may be involved in the development of this dermatosis. In the present study, the expression of metalloproteinase-2 (MMP-2) and metalloproteinase-9 (MMP-9) in inflammatory rosacea and in the control group is evaluated.

**Methods:** in a case-control study, inflammatory rosacea (n=34) and other dermatological diseases of the face, with an inflammatory pathogenesis (n=29) were evaluated, regarding the immunohistochemical expression of MMP-2 and MMP-9. The keratinocytes, histiocytes, fibroblasts, endothelial cells, pilar unit and extracellular matrix were studied. The stages of rosacea and its variants were compared to each other for the same immunohistochemical expression. The different skin phototypes were evaluated in the cases for an inverse correlation of the expression of metalloproteinases-2 and -9 (Spearman correlation). The associations were analyzed using the Mann-Whitney test.

**Results:** no differences were detected between the two groups for MMP-2 expression. The inflammatory rosacea group presented greater quantitative and qualitative expression in the histiocytes and in the extracellular matrix, for the expression of MMP-9 ( $p < 0.01$ ). No specific association of the stages and variants was observed regarding the expression of the MMPs. No type of correlation was detected between the phototypes and the presence of the enzymes.

**Conclusions:** MMP-9 is probably a pathogenic mediator that is characteristic of inflammatory rosacea, whereas MMP-2 is not. According to this study, there is no evidence that some stage or inflammatory variant of rosacea is more closely associated to the presence of the metalloproteinases studied, and there is also no

evidence that some cutaneous phototype is correlated to MMP-2 and MMP-9 expression.

**Key words:** metalloproteinases; gelatinases; rosacea; pathogenesis

## Introduction

Rosacea is a dermatosis that may present at different clinical stages and variants (special forms) or, as established more recently, in subtypes and one variant.<sup>1,2</sup> Its evolution may have important consequences for the quality of life of individuals, mainly due to lowered self-esteem.<sup>3,4</sup>

Considering the difficulty of improving therapeutic management, it is essential to recognize the pathogenic mediators involved, since blocking or inactivating their actions may provide the most adequate control of the disease.

The etiopathogenic foundation of rosacea is probably based on a tripod, with a vascular component, an inflammatory component and a component of destructuring the dermal tissue.<sup>5,6,7</sup> Each component has its own pathogenic phases, and temporary or permanent superimposals of these processes occur.<sup>7,8,9</sup>

Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and matrix metalloproteinase –9 (MMP-9) are enzymes called zinc-dependent endopeptidases and they are implicated in the development of several dermatological diseases, such as psoriasis and lichen planus.<sup>10-14</sup>

Due to their proteolytic actions on the collagen (“gelatin”), MMP-2 and MMP-9 are called gelatinases. MMP-2 is gelatinase A, with a molecular weight of 62 kDa, when activated. MMP-9 is gelatinase B, with a molecular weight of 82 kDa, when activated.<sup>15-17</sup>

These endopeptidases are elaborated by cells residing in the epidermis (keratinocytes) and in the dermis (fibroblasts, histiocytes, mastocytes and endothelial cells, mainly), and have extracellular action.<sup>18-22</sup> Among the activities of gelatinases, as part of an interrelationship with interleukin 1, alpha tumor necrosis factor and growth factors, are the remodeling of connective tissue, stimulation of angiogenesis and the induction of inflammatory processes.<sup>23-27</sup>



The possible association between these enzymes and the development of rosacea should be further studied. There is evidence of the presence of MMP-9 in ocular rosacea, but there are no publications on cutaneous rosacea. MMP-2 has not yet been described in association with rosacea.<sup>11,27</sup>

Indirectly, something that provides evidence of the association of metalloproteinases (MMPs) with rosacea is the *in vitro* demonstration that the antibiotics, tetracycline and doxycycline, traditionally used to treat rosacea, inhibit the action of these enzymes. This inhibition occurs in zymogen phase, after the mitochondrial enzymatic elaboration.<sup>28-32</sup>

In this study, the immunohistochemical method was used to evaluate the skin of patients with inflammatory lesions of rosacea and of patients with other inflammatory dermatoses (control group) as to the expression of gelatinases A and B.

The main objective was to find out whether MMP-2 and MMP-9 may be considered participants in the pathogenic process of cutaneous rosacea, since no specific data have been published on the subject.

Other objectives of the study were: to verify the existence of an association between the inflammatory stages and/or inflammatory variants of rosacea, and the expression of gelatinases, and to evaluate the occurrence of an inverse correlation between the cutaneous phototypes of patients with rosacea and the expression of metalloproteinases. 2 and 9.

## **Material and Methods**

In the Dermatology and Pathology Departments at Hospital de Clínicas de Porto Alegre (Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil), a case-control study was designed including patients of both sexes and

above the age of 18 years. The patients had stage II and III facial rosacea, or some special form with a superimposed inflammatory process, following the classification of Plewig and Kligmann.<sup>1</sup> According to the classification of the National Rosacea Society (NSR-United States of America),<sup>2</sup> were patients with subtype II rosacea and/or the granulomatous variant and/or facial central edema (a component of subtype I). Cutaneous phototypes were also evaluated as variables, using the Fitzpatrick classification,<sup>33</sup> and the histopathological evidence of the presence of *Demodex folliculorum*.

The following were excluded from the study: patients below the age of 18, pregnant women, rosacea patients who presented only vascular changes, patients with special forms of steroid, halogenic and gram-negative rosacea (classification of Plewig and Kligman), patients who were using or had used, in the last 30 days, corticosteroids, retinoids, immunosuppressants, antibiotics, nonsteroidal anti-inflammatory drugs and medication with antineutrophilic action, systemically and, in the last 7 days, the same medications topically. The control group consisted of patients without rosacea, but with other inflammatory dermatological diseases on the face. In this group the presence of *Demodex follicularum* in histopathological studies, was also evaluated. The same exclusion criteria were used. With the approval of the Ethics and Research Committee at Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil, and the informed consent having been understood and signed, the variables were collected and analyzed.

Thirty-four patients with rosacea (25 incident and 9 prevalent) and 29 control patients (16 incident and 13 prevalent) were selected. After performing a biopsy of the facial lesion using a 3mm punch, the material was fixed in 10% buffered formalin for 12 hours. Once routine procedures and inclusion in paraffin had been performed, the specimens were cut into 5-micrometer sections and evaluated by conventional histopathology, using the hematoxylin and eosin method (H-E).

Immunohistochemistry was performed with new 5-micrometer sections, according to the standards validated in published scientific experiments.<sup>34,35</sup> Slides were prepared with organosilane solution, rehydration was performed and endogenous peroxidase was blocked. Antigen recovery was performed using citrate buffer and then the primary antibodies for MMP-2 (Neomarkers, Incorporation, Fremont, USA) and MMP-9 (Chemicon International Incorporation, Temecula, USA), and the secondary antibody associated to the system of biotin-streptavidin amplification (DAKO Corporation, Carpinteria, USA) were applied for 30 minutes. Lastly, the chromogenous solution of diaminobenzidine (DAKO Corporation, Carpinteria, USA) was added, and counterstaining was performed with Harris hematoxylin. Once the antigen recovery had occurred, at all stages washing was previously done with PBS (sodium chloride with monobasic sodium phosphate and dibasic sodium phosphate (Reagen, Rio de Janeiro, Brazil).

The immunohistochemistry slides were interpreted by 4 different evaluators who did not know the patient's clinical history. The mean of the evaluations was used as the final result.

Semi-quantitative methods were used (0, when there was no staining present; 1+ when up to 25% of the structure or cell type were stained; 2+ when between 25-75% were stained; 3+ when over 75% were stained) and qualitative (intense, moderate or mild staining) adapted from methods described in the current literature.<sup>34,35</sup> The intensity of staining for purposes of statistical analysis, was codified by scale 0=no staining, mild= 1+, moderate=2+ and intense=3+.

The MMP expression was evaluated in the keratinocytes, in the histiocytes (monocytes and macrophages), in the fibroblasts, in the pilar unit, in the endothelial cells and in the extracellular matrix.

The data were statistically evaluated using the Mann-Whitney (MW) test,  $p < 0.05$  being considered significant. The linear correlation between variables was evaluated using the Spearman correlation. The data were analyzed using the SPSS software, version 11.

## Results

Forty-two (66.7%) of the 63 patients were female and 21(33.3%) were male. The age ranged from 19 to 76 years, the mean age of the cases was 43.23 years (standard deviation 10.90) and the mean age of controls was 47 (standard deviation 14.48). There was no statistically significant difference between the ages of the two groups ( $p = 0.245$ ).

Among the 34 cases, 20 patients (58.8%) were classified as stage II, 8 patients (23.5%) stage III, 1 patient (2.9%) had phyma associated to stage II and 5 patients (14.7%) had granulomatous rosacea. In the subtype 2 (papulopustular rosacea), stages II and III were added together, making up 28 patients in the sample (82.4%). As to the cutaneous phototypes of the rosacea patients, there were 13 with phototype II (38.2%), 18 with phototype III (52.9%), 1 with phototype IV (2.9%) and 2 with phototype V (5.9%).

Among the 29 controls with inflammatory dermatoses in the face that were submitted to biopsy, 13 patients with chronic lupus erythematosus, 4 with subacute lupus erythematosus, 2 with contact dermatitis, 2 with sarcoidosis, 2 with photodermatitis and 1 with each of the following dermatoses: lymphocytic infiltrate of Jessner, exfoliative dermatitis, solar polymorphic eruption, seborrheic dermatitis, dermatomyositis and actinic prurigo.

In the rosacea cases, histopathology using H-E showed the presence of *Demodex folliculorum* in 12 biopsies (35.3%) and the absence of the mite in 22 (64.7%). *Demodex folliculorum* was found in 2 controls (6.9%) and was absent in 27 patients (93.1%). The difference between cases and controls for the presence of *Df* was statistically significant ( $p < 0.05$ ).

Immunohistochemical expression of MMP-2, among the cellular types and structures evaluated, was negative (or = 0) in the keratinocytes, in 2 cases and 3 controls (8.6% of the general sample); in the fibroblasts, in 1 case (1.6% of the general sample); in the extracellular matrix, in 21 cases and 22 controls (74.1% of the general sample); in the pilar unit, in 1 control (1.8% of the general sample); and in the endothelial cells, in 2 cases and 1 control (5.2% of the general sample). In the other cases and controls, all the cell types and structures were positive for the presence of MMP-2 (table 1).

Regarding positivity between quantity (1+, 2+ and 3+) and intensity of staining of MMP-2, no statistically significant differences were found for any cell type or structure analyzed when the cases and control groups were compared (for all parameters,  $p > 0.05$ , using the MW test).

Immunohistochemical expression of MMP-9, among the cell types and structures evaluated, was negative (or = 0) in the keratinocytes, in 1 case and 3 controls (6.6% of the general sample); in the histiocytes, in 1 control (1.6% of the general sample); in the fibroblasts, in 2 cases and 2 controls (6.6% of the general sample); in the extracellular matrix, in 16 cases and 23 controls, (8.4% of the general sample); and in the endothelial cells, in 3 cases and 3 controls (9.8% of the general sample). In the other cases and controls, all the cell types and structures were positive for the presence of MMP-9 (table 2).

Regarding positivity between quantity (1+, 2+ and 3+) and intensity of staining, MMP-9 was present to a significantly higher extent in the cases of rosacea,

as to the following parameters: A) Histiocytes: cases of rosacea – positivity mean= 2.30 and median= 2; controls – positivity mean =1.85 and median=2; with  $p < 0.01$ . The intensity of staining was moderate among the histiocytes of the cases and mild to moderate in the controls, with  $p < 0.01$ . B) Extracellular matrix: cases of rosacea - positivity mean= 0.58 and median= 1; controls - positivity mean = 0.25 and median= 0, with  $p < 0.01$ . Staining intensity was mild in the extracellular matrix of the cases and extremely mild in the controls, with  $p < 0.01$ . C) Fibroblasts: cases of rosacea - positivity mean= 2.03 and median= 2; controls - positivity mean= 1.61 and median= 2, with  $p = 0.05$ . The intensity of staining was mild to moderate in both groups, with no significant statistical difference. D) Keratinocytes: the intensity of staining was moderate in the cases and mild in the controls, with  $p < 0.05$ . No differences were found between the groups in semi-quantitative analysis. The semi-quantitative and qualitative analysis of the expression of MMP-9 in the other cell types and structures did not show significant differences between the two groups ( $p > 0.05$ ).

Tables 1 and 2 show, respectively, all the parameters evaluated as to quantitative and qualitative expression of MMP-2 and MMP-9 in the cases and controls, with mean, standard deviation, median and minimum and maximum values, besides the significance analyses performed by the Mann-Whitney test.

Figure 1 shows positivity 1+ and mild in the keratinocytes in a control patient, to the expression of MMP-9; figure 2 shows positivity 3 + and intense in the keratinocytes in a patient with rosacea, to the expression of MMP-9; figure 3 shows positivity 3+ and intense in the fibroblasts in a control patient to the expression of MMP-2 and figure 4 shows positivity 2+ and moderate in the histiocytes and adjacent areas of the matrix in a patient with rosacea, to the expression of MMP-9.

As to the association between the clinical stages of rosacea and the degree of positivity and intensity of the immunohistochemical expression of MMP-2 and MMP-9, no statistically significant differences could be detected ( $p > 0.05$ ). Equally, using

the Spearman correlation ( $r_s$ ), no correlations were detected between cutaneous phototypes as to expressiveness of metalloproteinases that were being studied.

## Discussion

In this study the significant presence of MMP-9 in inflammatory rosacea was demonstrated *in vivo* in the histiocytes and in the extracellular matrix, as compared to the control patients ( $p < 0.01$ ). Furthermore, the other cell types and structures evaluated also demonstrated that they often express metalloproteinases –2 and –9, but without any statistically significant differences between the groups. (Table 1 and 2). Fibroblasts showed a higher frequency of positivity among the cases of rosacea for the expression of MMP-9, with a statistical difference, although not reaching significance, but being at the limit ( $p = 0.05$ ).

Immunohistochemical expression of MMP-2 occurred frequently, but not very preferentially among the cell types and structures evaluated in cases and controls. No statistically significant differences were found as to the expression of gelatinase A, between the two groups, concerning the semi-quantitative and qualitative analyses employed in the study.

These findings are compatible with research studies that showed that MMP-2 is an enzyme that is widely distributed among several diseases (dermatological and other) and may even be found in normal skin, since it has an important function in the physiological remodeling of the dermal connective tissue.<sup>36-40</sup>

Thus, it appears true that MMP-2 is an enzyme whose action is not always deleterious, but which may perform pathogenic activities in certain contexts and has a broad spectrum of actions, since it has already been found in psoriasis, in lichen planus, in toxic epidermal necrolysis, in the final stages of skin ulcer healing, in keloids and hypertrophic scars and in certain skin neoplasms.<sup>12, 13, 14, 37, 41-47</sup>

MMP-9, on the other hand, an enzyme stimulated by many extraphysiological factors, including ultraviolet radiation and infections, appears to carry out activities with greater short term pathogenic capacity.<sup>49,50,51</sup> In the skin, it has already been associated to the process of acute photodamage, psoriasis, anetoderma and bullous pemphigoid, among other dermatoses.<sup>12,13,14,41,48,49,52,53</sup>

MMP-9 is elaborated mainly by keratinocytes and inflammatory cells, in particular, neutrophils and histiocytes. The fibroblasts, endothelial cells and sebaceous and eccrine glands can also participate in certain pathogenic processes, elaborating this metalloproteinase.<sup>16,17,19,54</sup>

It is recognized that the regulatory axis of the MMPs involves: a) the initial biological stimulus for the secretion of cytokines, such as interleukin-1 and alpha tumor necrosis factor, and growth factors such as the beta transforming growth factor; b) the activation of zymogenic forms of the MMPs by membrane type matrix metalloproteinases (MT-MMP); c) interaction between the epidermal and dermal cells and between the extracellular matrix and these cells; and d) the presence of tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs).<sup>36,55</sup>

Using the scheme proposed by Fisher *et al.*, in 1997,<sup>56</sup> to explain the influence of the ultraviolet rays (extra-physiological factor) on metalloproteinase secretion, the hypothetical scheme for the etiopathogeny of rosacea suggested by Bamford, in 2001,<sup>57</sup> and considering the regulatory axis described above, rosacea could be the result of frequent stimuli (ultraviolet radiation and internal biological factors, such as the elaboration of mediators that cause vasodilation and inflammation) on the cells elaborating MMP-9.

The excessive presence of MMP-9 which is not fully controlled by its specific tissue inhibitor, the glucoprotein of 28 kDa called TIMP-1, would allow prolonged action of the activated form of the enzyme (with 82 kDa) on the type IV, V, VII, X and



XIV collagens, elastin, entactin and other components of the extracellular matrix.<sup>36</sup>

58,59

Furthermore, due to its own pro-inflammatory actions, and by stimulating the chemotaxis of inflammatory cells, such as the histiocytes and neutrophils, it would extend the damage to the matrix, increasing its destructuring, which would cause lymphatic incapacity to remove the fluids that overflowed to the interstitium after the episodes of flushing-type temporary vasodilation and diminish the architectural incapacity of the dermal vascular network, making it easier to permanently form ectatic vessels.<sup>6,15,16,36</sup>

In this study, the differentiated semi-quantitative and qualitative expression of MMP-9 occurred in the histiocytes of the cases ( $p < 0.01$ ). These cells are considered habitually resident cells of the dermis, but they were present in great number in the inflammatory processes in the cases of rosacea.

Little expression was seen in the extracellular matrix. The area adjacent to the secretory cells of the MMPs is only occasionally stained using the immunohistochemistry techniques,<sup>45,46,47,60</sup> although Keski-Oja *et al.* have demonstrated that gelatinases are not only secreted by fibroblasts, they also are deposited around these cells, in a stromal area, in a zymogenic and activated form.<sup>21</sup> Even so, in patients who have cutaneous rosacea, there was a greater quantitative and qualitative expression of MMP-9 as compared to the controls, with statistical significance ( $p < 0.01$ ). Studies with similar observations were published in ocular rosacea.<sup>11,27</sup>

In conclusion, even though these findings provide an evidence of a possible role of MMP-9 in the pathogenesis of inflammatory rosacea (stage II, III and granulomatous variant), studies using other methods, such as zymography, can show the degree of activity of this gelatinase on the patients' skin.

As to MMP-2, although it has not shown itself to be a characteristic mediator of inflammatory rosacea, it may equally contribute to its pathogenesis, because this enzyme was present in most cases of rosacea.

Besides helping achieve a partial understanding of the pathogenesis of inflammatory rosacea, these data may help corroborate, biologically, the use of some medications that were traditionally employed to treat rosacea, such as tetracycline and doxycycline which have an inhibitory action on the MMPs.<sup>6,28-30</sup>

Other synthetic MMP-inhibitors are already being experimentally tested for diseases strongly mediated by these enzymes.<sup>61,62</sup> Rosacea could possibly be included in this list.

### **Acknowledgements**

We thank biologist Ivana Höfke de Souza Gallota and Dr. Andréa Rodrigues C. Pires for their help in carrying out and initially interpreting the immunohistochemistry. We thank Prof. Dr. Mário Wagner, for his biostatistical support. We thank the Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos at Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE) and the Fundação Médica do Rio Grande do Sul for the financial assistance which made this study possible.

## References

1. PLEWIG G, KLIGMAN AM. Rosacea. In: PLEWIG G, KLIGMAN AM, editors. Acne and rosacea. 3<sup>rd</sup> ed. Berlin: Springer-Verlag; 2000. p. 456-501.
2. WILKIN J, DAHL M, DETMAR M, DRAKE L, FEINSTEIN A, ODOM R, POWELL F. Standard classification of rosacea: report of the National Rosacea Society expert committee on the classification and staging of rosacea. *J Am Acad Dermatol* 2002;46:584-7.
3. ZUBER TJ. Rosacea. *Dermatology* 2000; 27: 309-318.
4. COHEN CG, KRAHN L, WISE TN, EPSTEIN S, ROSS R. Desiluions of disfigurement in a woman with acne rosacea. *Gen Hosp Psychiatry* 1991; 13:273-7.
5. REBORA A. Rosacea. *J Invest Dermatol* 1987 88; Suppl 1:56-60.
6. WILKIN JK. Rosacea. *Pathophysiology and treatment*. Arch Dermatol 1994;130: 359-62.
7. NEUMANN E, FRITZH A. Capillaropathy and capillaroneogenesis in the pathogenesis of rosacea. *Int J Dermatol* 1998;37:263-6.
8. THIBOUTOT DM. Acne Rosacea. *Am Fam Physician* 1994;50:1691-7.
9. GREAVES MW. Flushing and Flushing Syndromes, Rosacea and Perioral Dermatitis. In: CHAMPION RH, BURTON JL, BURNS DA, BREATHNACH SM, editors. Rook/Wilkinson/Ebling Textbook of Dermatology. 6th ed. Oxford: Blackwell Science; 1998. p.2099-2112.
10. HAN YP, TUAN TL, WU H, HUGES M, GARNER WL. TNF-alpha stimulates activation of pro-MMP-2 in human skin through NF-(kappa) B mediated induction of MT1-MMP. *J Cell Sci* 2001; 114:131-39.
11. AFONSO AA, SOBRIN L, MONROY DC, SELZER M, LOKESSHAWAR B, PFLUGFELDERP SC. Tear fluid gelatinase B activity correlates with IL-1 alpha

concentration and fluorescein clearance in ocular rosacea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40: 2506-12.

12. FELICIANI C, VITULLO P, D'ORAZI G, PALMIROTTA R, AMERIO P, MOHAMMAD PS, *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: 321-7.

13. SUOMELA S, KARINIEMI AL, SNELLMAN E, SAARIALHO-KERE U. Metalloelastase (MMP-12) and 92-kDa gelatinase (MMP-9) as well as their inhibitors, TIMP-1 and -3 are expressed in psoriatic lesions. *Exp Dermatol* 2001;10:175-83.

14. GIANNELLI G, BRASSARD J, FOTI C, STLETER-STEVENSON WG, FALK-MARZILLIER J, ZAMBONIN-ZALONE A, *et al.* Altered Expression of Basement Membrane Proteins and Their Integrins Receptors in Lichen Planus: Possible Pathogenetic Role of Gelatinases A and B. *Laboratory Inv* 1996;74: 1091-1104.

15. SELTZER JL, ADAMS AS, GRANT GA, EISEN AZ. Purification and properties of a gelatin-specific neutral protease from human skin. *J Sci Biol Chem* 1981;256: 4662-8.

16. COLLIER IE, WILHELM SM, EISEN AZ, MARMER BL, GRANT GA, SELTZER JL, *et al.* H-ras oncogen-transformed human bronchial epithelial cells (TBE-1) secrete a single metalloproteinase capable of degrading basement membrane collagen. *J Biol Chem* 1988;263:6579-87.

17. COLLIER IE, BRUNS GA, GOLDBERG GI, GERHARD DS. On the structure and chromosome location of the 72- and 92-kDa human type IV collagenase genes. *Genomics* 1991;9: 429-34.

18. MAILLARD JL, FAVREAU C, REBOUD RM. Role of monocyte/macrophage derived matrix-metaloproteinases (gelatinases) in prolonged skin inflammation. *Clin Chim Acta* 1995;233:61-74.

19. KANBE N, TANAKA A, KANBE M, ITAKURA A, KUROSAWA M, MATSUDA H. Human mast cells produce matrix metalloproteinase 9. *Eur J Immunol* 1999;29:2645-9.
20. LI L, AKERS K, EISEN A, SELTZER JL. Activation of gelatinase A (72-kDa collagenase) induced by monensin in normal human fibroblasts. *Exp Cell Res* 1997;232: 322-30.
21. 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: 1167-77.
22. AMANO S, AKUTSU N, NISHIMA T, CHAMPLIAUD MF, BURGESSON RE, ADACHI E. Importance of balance between matrix synthesis and degradation in basement membrane formation. *Exp Cell Res* 2001;271:249-62.
23. HAN YP, TUAN TL, HUGES M, GARNER WL. Transforming growth factor-beta and tumor necrosis factor-alpha-mediated induction and proteolytic activation of MMP-9 human skin. *J Biol Chem* 2001;276:22341-50.
24. BERANGER JY, GODEAU G, FRANCES C, ROBERT L, HORNEBECK W. Presence of gelatinase A and metalloelastase type protease at the plasma membrane of human skin fibroblasts. Influence of cytokines and growth factors on cell-associated metalloendopeptidase levels. *Cell Biol Int* 1994;18:715-22.
25. KESKI-OJA, LOHI J, TUTILA A, TRYGUASON K, VARTIO T. Proteolytic processing of the 72.000-Da type IV collagenase by urokinase plasminogen activator. *Exp Cell Res* 1992;202:471-6.
26. WONG WR, KOSSODO S, KOICHEVAR IE. Influence of cytokines on matrix metalloproteinases produced by fibroblasts cultured in monolayer and collagen gels. *J Formos Med Assoc* 2001;100:377-82.

27. SOBRIN L, LIU Z, MONROY DC, SOLOMON A, SELZER MG, LOKESHWAR BL, *et al.* Regulation of MMP-9 activity in human tear fluid end corneal epithelial culture supernatant. *Inv Ophthalmol Vis Science* 2000;41:1703-09.
28. RUBINS JB, CHARBONEAU D, ALTER MD, BITTERMAN PB, KRATTZKE RA. Inhibition of mesothelioma cell growth in vitro by doxycycline. *J Lab Clin Med* 2001; 138:101-6.
29. RYAN ME, USMAN A, RAMAMURTHY NS, GOLUB LM, GREENWALD RA. Excessive matrix metalloproteinase activity in diabetes: inhibition by tetracycline analogues with zinc reactivity. *Curr Med Chem* 2001;8:305-16.
30. SAIHAN EM, BURTON JL. A double-blind trial of metronidazole versus oxytetracycline therapy for rosacea. *Br J Dermatol* 1980; 102:443-5.
31. QUATERMAN MJ, JOHNSON DW, ABELE DC, LESHER JL, HULL DS, DAVIS LS. Ocular rosacea. Signs, symptoms, and tear studies before and after treatment with doxycycline. *Arch Dermatol* 1997; 133:89-90.
32. TORRESANI C, PAVESI A, Manara GC. Clarithromycin versus doxycycline in the treatment of rosacea. *Int J Dermatol* 1997; 36:942-6.
33. FITZPATRICK TB, ORTONNE J-P. Normal skin color and general considerations of pigmentary disorders. In: FREEDBERG IM, EISEN AZ, WOLFF K, AUSTEN KF, GOLDSMITH LA, KATZ SI, editors. *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine*. 6<sup>th</sup> edition. New York: McGraw-Hill 2003; p.819-836.
34. BODEY B, BODEY B, SIEGALI SE, KAISER HE. Matrix metalloproteinase expression in malignant melanomas: tumor-extracellular matrix interactions in invasion and metastasis. *In Vivo* 2001;15:57-64.
35. SENTURK N, YILDIZ L, SULLU Y, KANDEMIR B, TURANLI AY. Expression of bcl-2 protein in active skin lesions of Behçet. *Int J Dermatol* 2001;40:747-50.
36. 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. *Dermatology in General Medicine*. 6<sup>th</sup> ed. New York: McGraw-Hill, 2003 p. 200-209.

37. MAEDA A, SOBEL RA. Matrix metalloproteinases in the normal human central nervous system, microglial nodules, and multiple sclerosis lesions. *J Neuropathol Exp Neurol* 1996;55: 300-09.

38. HUGES PM, WELLS GMA, CLEMENTS JM, GEARING JH, REDFORD EJ, DAVIES M, *et al.* Matrix metalloproteinase expression during experimental autoimmune neuritis. *Brain* 1998;121: 481-94.

39. BROWN PD, BLOXIDGE RE, STUART NSA, GATTER KC, CARMICHAEL J. Association Between expression of Activated 72-Kilodalton Gelatinase and Tumor Spread in Non-Small Cell Lung Carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1993;85:574-8.

40. TOMINAGA M, MIGITA K, NAKAMURA H, ICHINOSE Y, FURUYA T, ORIGUCHI T, *et al.* Expression of metalloproteinase-2 (gelatinase A) in labial salivary glands of patients with Sjögren syndrome with HTLV-1 infection. *Clin Exp Rheumatol* 1999;17:463-6.

41. PAQUET P, NUSGENS BV, PIÉRARD GE, LAPIÈRE M. Gelatinases in drug-induced toxic epidermal necrolysis. *Eur J Clin Invest* 1998; 28:528-32.

42. YAGER DR, ZHANG LY, LIANG HX, DIEGELMANN RF, COHEN K. Wound fluids from human pressure ulcers contain elevated matrix metalloproteinase levels and activity compared to surgical wound fluids. *J Invest Dermatol* 1996;107: 743-8.

43. COOK H, DAVIES KJ, HARDING KG, THOMAS DW. Defective extracellular matrix reorganization by chronic wound fibroblasts is associated with alterations in TIMP-1, TIMP-2, MMP-2 activity. *J Invest Dermatol* 2000;115:225-33.

44. NEELY AN, CLENDENING CE, GARDNER J, GREENHALGH DG, WARDEN GD. Gelatinase activity in keloids and hypertrophic scars. *Wound Repair and Regeneration* 1999;7: 166-71.

45. TSUKIFUJI R, TAGAWA K, HATAMUCHI A, SHINKAI H. Expression of matrix metalloproteinase-1, -2, -3 in squamous cell carcinoma and actinic keratosis. *Br J Cancer* 1997;80:1087-91.
46. VARANI J, HATTORI Y, SCHMIDT T, PERONE P, ZEIGLER ME, FADER DJ, *et al*. Collagenolytic and gelatinolytic matrix metalloproteinases and their inhibitors in basal cell carcinoma of skin: comparison with normal skin. *Br J Cancer* 2000;82:657-65.
47. VÄISÄNEN A, TUOMINEN H, KALLIOINEN M, TUPENNIEMI-HUJANEN T. Matrix metalloproteinase-2 (72kDa type Iv collagenase) expression occurs in the early stage of human melanocytic tumour progression and may have prognostic value. *J Pathol* 1996;180:283-89.
48. KOIVUKANGAS V, KALLIOINEN M, AUTIO HH, OIKARINEN A. UV irradiation induces the expression of gelatinases in human skin in vivo. *Acta Derm Venereol* 1994;74:279-82.
49. 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 fibroblast in culture. *Cell Biol Int* 1997;21:347-52.
50. PERIDES G, TANNER-BROWN LM, ESKILDSEN MA, KLEMPNER MS. *Borrelia burgdoferi* induces matrix metalloproteinases by neural cultures. *J Neurosci Res* 1999;58:779-90.
51. MORY N, SATO H, HAYASHIBIRA T, SENBA M, GELAZIUNAS C, WADA A, *et al*. *Helicobacter pylori* induces matrix metalloproteinase-9 through activation of nuclear factor kappa B. *Gastroenterology* 2003;124:983-92.
52. 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;24:118-29.



53. VENENCIE PY, BONNEFOY A, GOGLY B, KUT C, PELLAT B, HORNEBECK W, *et al.* Increased expression of gelatinases A and B skin explants from patients with anetoderma. *Br J Dermatol* 1997;137:517-25.
54. 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;273:5400-04.
55. PENDAS AM, MATILLA T, ESTIVIL X, LÓPEZ-OTIN C. The human collagenase-3 (CLG-3) gene is located on chromosome 11q22.3 clustered to other members of the matrix metalloproteinase gene family. *Genomics* 1995;10: 615.
56. FISHER GJ, WANG Z, DATTA SC, VERANI J, KANG S, VOORHEES JJ. Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light. *N Eng J Med* 1997;337:1419-28.
57. BAMFORD JT. Rosacea: current thoughts on origin. *Semin Cutan Med Surg* 2001;20:199-206.
58. GOMÉZ DE, ALONSO DF, YOSHIJI H, THORGEIRSSON UP. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol* 1997;74:111-22.
59. SUGITA Y, MORITA E, TANAKA T, NAKAMURA K, YAMAMOTO S. Production of tissue inhibitor of metalloproteinase -1 and -2 by cultured keratinocytes. *J Dermatol Sci* 2000;22:107-16.
60. Thewes M, Woret WI, Engst R, Ring J. Stromelysin-3 (ST-3): immunohistochemical characterization of the matrix metalloproteinase (MMP)-11 in benign and malignant skin tumours and other skin disorders. *Clin Exp Dermatol* 1999;24:122-6.
61. LEVITT NC, ESKENS FA, O'BYRNE KJ, PROPPER DJ, DENIS LJ, OWEN SJ, *et al.* Phase I and pharmacological study of the oral matrix metalloproteinase inhibitor,

MMI270 (CGS27023A), in patients with advanced solid cancer. *Clin Cancer Res* 2001;7:1912-22.

62. SAWA M, TSUKAMOTO T, KIYOI T, KUROKAWA K, NAKAJIMA F, NAKADA Y, *et al.* New strategy for antedrug application: development of metalloproteinase inhibitors as antipsoriatic drugs. *J Med Chem* 2002;45:930-6.

**Table 1** – Semi-quantitative e qualitative analysis of MMP-2 in cases and controls.

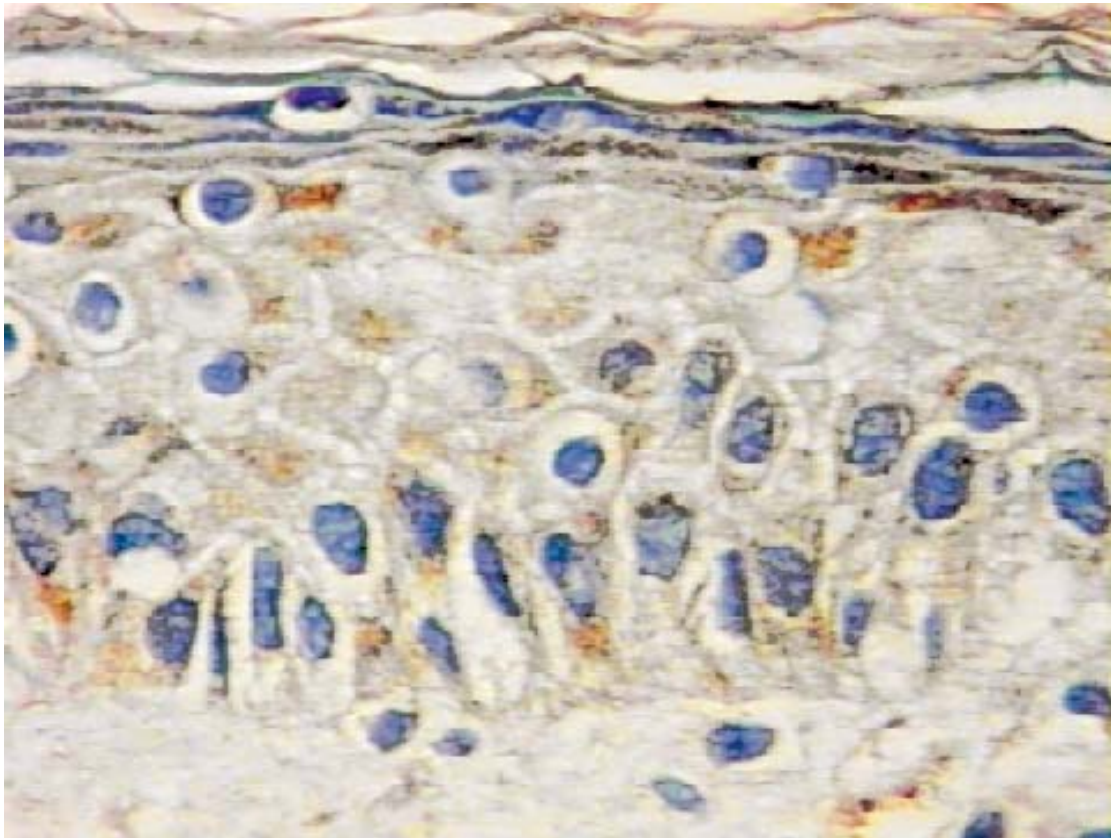
MMP 2	Cases of Rosacea n=34					Controls n=29					p MW
	Mean	Standard deviation	Median	Minimum	Maximum	Mean	Standard deviation	Median	Minimum	Maximum	
Epi Q	2,09	1,00	2,00	0,00	3,00	2,08	1,06	2,00	0,00	3,00	0,99
Epi q	1,50	0,72	1,50	0,00	3,00	1,46	0,86	1,00	0,00	3,00	0,81
H Q	1,88	0,79	2,00	1,00	3,00	1,73	0,72	2,00	1,00	3,00	0,50
H q	1,47	0,57	1,00	1,00	3,00	1,50	0,51	1,50	1,00	2,00	0,73
Fib Q	1,88	0,79	2,00	0,00	3,00	1,77	0,82	2,00	1,00	3,00	0,52
Fib q	1,66	0,79	2,00	0,00	3,00	1,58	0,58	2,00	1,00	3,00	0,76
Mtz Q	0,38	0,55	,00	0,00	2,00	0,15	0,37	,00	0,00	1,00	0,10
Mtz q	0,44	0,67	,00	0,00	2,00	0,15	0,37	,00	0,00	1,00	0,08
Up Q	2,16	0,86	2,00	1,00	3,00	2,13	0,95	2,00	0,00	3,00	0,96
Up q	1,65	0,61	2,00	1,00	3,00	1,57	0,66	2,00	0,00	3,00	0,75
En Q	1,69	0,82	2,00	0,00	3,00	1,62	0,80	1,50	0,00	3,00	0,65
En q	1,34	0,65	1,00	0,00	3,00	1,38	0,57	1,00	0,00	2,00	0,73

MMP-2: matrix metalloproteinase-2; Q: quantitative; q: qualitative; Epi: epidermis; H: histiocytes; Fib: fibroblasts; Mtz: matrix; Up: pilar unit; En: endothelium; MW: Mann-Whitney.

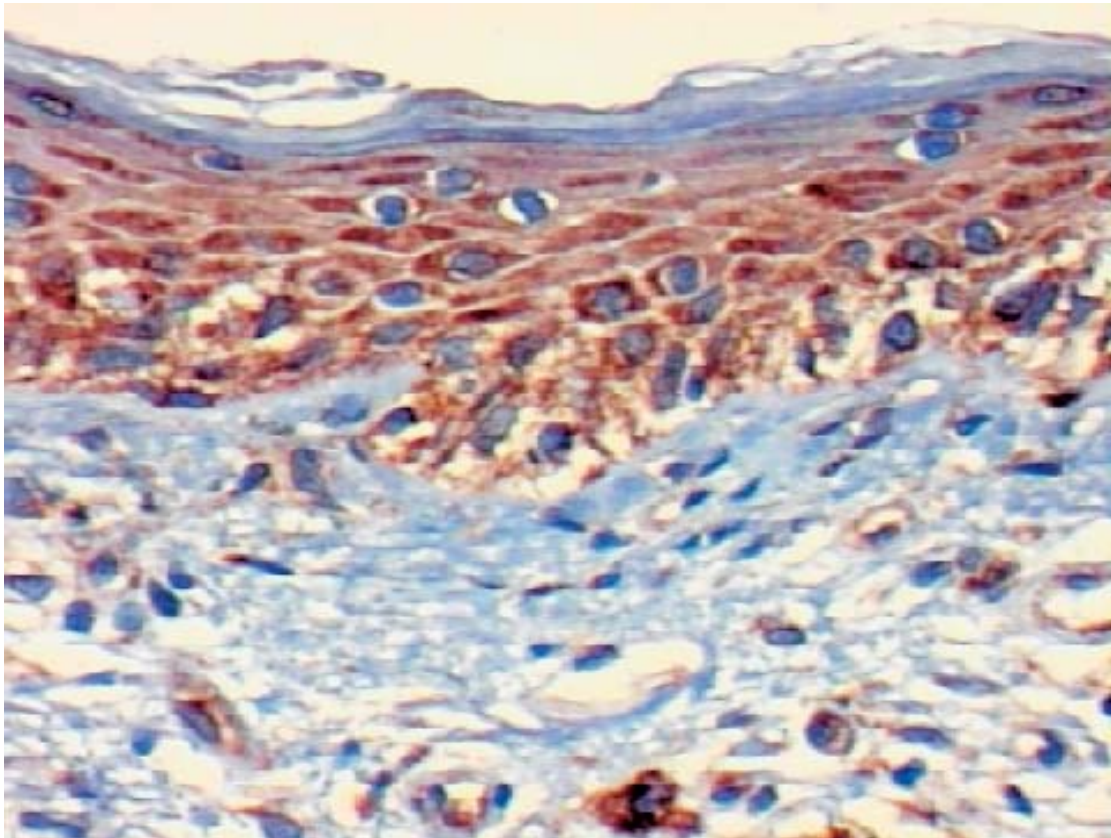
**Table 2** – Semi-quantitative e qualitative analysis of MMP-9 in cases and controls.

MMP 9	Cases of Rosacea n=34					Controls n=29					p MW
	Mean	Standard deviation	Median	Minimum	Maximum	Mean	Standard deviation	Median	Minimum	Maximum	
EpiQ	2,15	0,83	2,00	0,00	3,00	1,75	0,93	2,00	0,00	3,00	0,09
Epi q	1,85	0,76	2,00	0,00	3,00	1,36	0,78	1,00	0,00	3,00	0,02
H Q	2,39	0,61	2,00	1,00	3,00	1,36	0,80	2,00	0,00	3,00	0,01
H q	2,00	0,56	2,00	1,00	3,00	1,54	0,69	1,50	0,00	3,00	0,04
Fib Q	2,03	0,88	2,00	0,00	3,00	1,61	0,83	2,00	0,00	3,00	0,05
Fib q	1,70	0,68	2,00	0,00	3,00	1,43	0,69	1,00	0,00	3,00	0,09
Mtz Q	0,58	0,61	1,00	0,00	2,00	0,25	0,59	0,00	,00	2,00	0,01
Mtz q	0,70	0,77	1,00	0,00	2,00	0,25	0,59	0,00	0,00	2,00	0,01
Up Q	2,21	0,86	2,00	0,00	3,00	2,00	0,98	2,00	0,00	3,00	0,42
Up q	1,85	0,80	2,00	0,00	3,00	1,58	0,76	2,00	0,00	3,00	0,20
En Q	1,79	0,93	2,00	0,00	3,00	1,61	0,99	1,00	0,00	3,00	0,42
En q	1,55	0,83	2,00	0,00	3,00	1,29	0,71	1,00	0,00	3,00	0,20

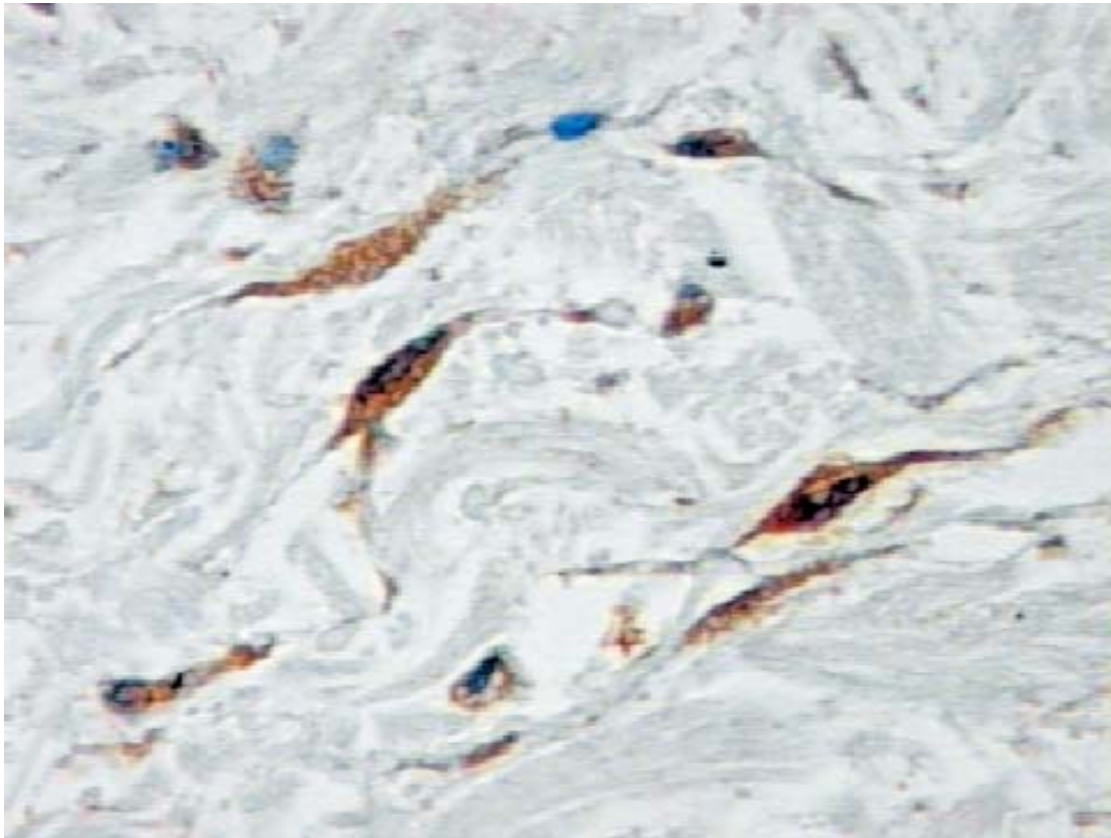
*MMP-9: matrix metalloproteinase-2; Q: quantitative; q: qualitative; Epi: epidermis; H: histiocytes; Fib: fibroblasts; Mtz: matrix; Up: pilar unit; En: endothelium; MW: Mann-Whitney*



**Figure 1** - Expression of MMP-9 in control patient: **1+** and **mild** in keratinocytes (imunoperoxidase-DAB, x 400, original magnification)

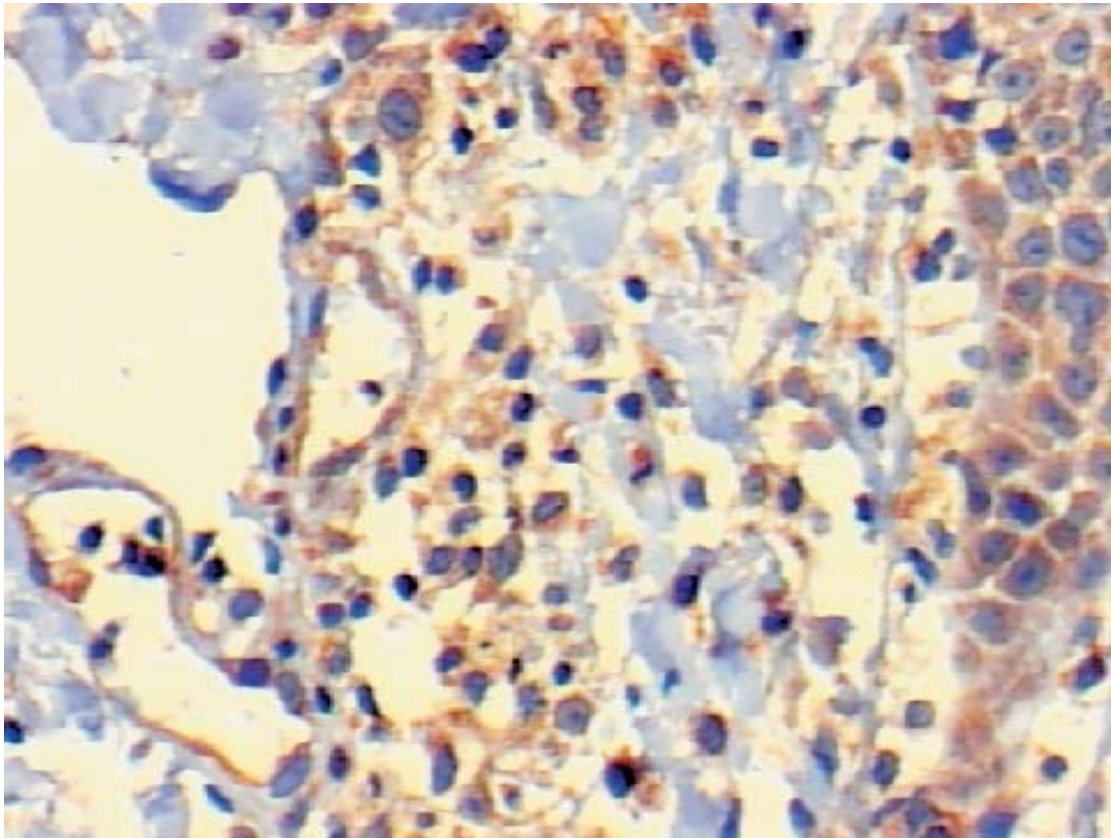


**Figure 2** – Expression of MMP-9 in rosacea patient: **3+** and **intense** in keratinocytes (immunoperoxidase-DAB, x 250, original magnification)



**Figure 3** – Expression of MMP-2 in control patient: **3+** and **intense** in fibroblasts (imunoperoxidase-DAB, x 400, original magnification)





**Figure 4** – Expression of MMP-9 in rosacea patient: **2+** and **moderate** in histiocytes and adjacent area (imunoperoxidase-DAB, x 250, original magnification)



## **5.2. Versão em português do artigo 1**

*“Immunohistochemical expression of metalloproteinases-2 and -9 in rosacea: a case-control study”*

**A expressão imunoistoquímica das metaloproteinases-2 e -9 na rosácea: um estudo de casos e controles.**

### **Autores**

Renan Rangel Bonamigo, Lucio Bakos, Maria Isabel Albano Edelweiss, André Cartell.

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

### **Correspondência**

Renan Rangel Bonamigo – Rua Dr. Vale 605/401B, CEP 90560-010, Porto Alegre, RS, Brasil. Telefone:+55.51.33467209; Fax:+55.51.33467209; correio eletrônico: [rbona@portoweb.com.br](mailto:rbona@portoweb.com.br)

## Resumo

**Fundamentos:** a rosácea possui importantes estágios e variantes com um componente inflamatório. Muitos aspectos da patogênese da rosácea ainda são discutidos e as metaloproteinases da matriz (MMPs) são enzimas que poderiam estar envolvidas no desenvolvimento dessa dermatose. No presente estudo é avaliada a expressão da metaloproteinase-2 (MMP-2) e da metaloproteinase-9 (MMP-9) na rosácea inflamatória e em grupo controle.

**Métodos:** em um estudo de casos e controles, foram avaliadas a rosácea inflamatória (n= 34) e outras doenças dermatológicas da face com patogênese inflamatória (n= 29), quanto à expressão imunoistoquímica da MMP-2 e MMP-9. Foram estudados os queratinócitos, os histiócitos, os fibroblastos, as células endoteliais, a unidade pilar e a matriz extracelular. Os estágios da rosácea e suas variantes foram comparados entre si para a mesma expressão imunoistoquímica. Nos casos, os diferentes fototipos cutâneos foram avaliados para uma correlação inversa à expressão das metaloproteinases-2 e -9 (correlação de Spearman). As associações foram analisadas pelo teste de Mann-Whitney.

**Resultados:** não foram detectadas diferenças entre os dois grupos para a expressão da MMP-2. O grupo da rosácea inflamatória apresentou maior expressão quantitativa e qualitativa nos histiócitos e na matriz extracelular, para a expressão da MMP-9 ( $p < 0,01$ ). Não foi evidenciada associação específica dos estágios e variantes quanto à expressão das MMPs. Não foi detectado algum tipo de correlação entre os fototipos e presença das enzimas.

**Conclusões:** a MMP-9 provavelmente constitui-se em um mediador patogênico característico da rosácea inflamatória, enquanto a MMP-2, não. Por esse estudo, não há evidências que algum estágio ou variante inflamatória da rosácea esteja mais associado à presença das metaloproteinases estudadas, assim como

não há evidências que algum fototipo cutâneo esteja correlacionado com a expressão da MMP-2 e MMP-9.

**Palavras-chave:** metaloproteinases; gelatinases; rosácea; patogênese

## Introdução

A rosácea é uma dermatose que pode se apresentar em diferentes estágios clínicos e variantes (formas especiais) ou, como mais recentemente estabelecido, em subtipos e uma variante.<sup>1,2</sup> Sua evolução pode acarretar importantes conseqüências à qualidade de vida de seu portador, principalmente pela diminuição da auto-estima.<sup>3,4</sup>

Diante das dificuldades para melhorar o manejo terapêutico, é fundamental o reconhecimento dos mediadores patogênicos envolvidos, já que o bloqueio ou a inativação das ações dos mesmos pode ocasionar o controle mais adequado da doença.

A base etiopatogênica da rosácea provavelmente está alicerçada em um tripé, com um componente vascular, um componente inflamatório e um componente da desestruturação do tecido dérmico.<sup>5,6,7</sup> Cada componente possui etapas patogênicas próprias, ocorrendo sobreposições temporárias ou permanentes desses processos.<sup>7,8,9</sup>

A metaloproteinase-2 da matriz (MMP-2) e a metaloproteinase-9 da matriz (MMP-9) são enzimas denominadas endopeptidases zinco-dependentes e estão implicadas no desenvolvimento de algumas doenças dermatológicas, como a psoríase e o líquen plano.<sup>10-14</sup>

Por suas ações proteolíticas sobre o colágeno (“gelatina”), a MMP-2 e a MMP-9 são denominadas de gelatinases. A MMP-2 é a gelatinase A, possuindo peso molecular de 62 kDa, quando ativada. A MMP-9 é a gelatinase B, possuindo peso molecular de 82 kDa, quando ativada.<sup>15-17</sup>

Essas endopeptidases são elaboradas por células residentes no epiderma (queratinócitos) e no derma (fibroblastos, histiócitos, mastócitos e células endoteliais, principalmente) e possuem ação extracelular.<sup>18-22</sup> Inseridas em inter-

relações com interleucina 1, o fator de necrose tumoral alfa e fatores de crescimento, as gelatinases possuem entre as suas atividades o remodelamento do tecido conjuntivo, o estímulo à angiogênese e a indução de processos inflamatórios.<sup>23-27</sup>

A possível associação entre essas enzimas e o desenvolvimento da rosácea deve ser mais estudada. Há evidências da presença da MMP-9 na rosácea ocular, mas não há publicações quanto à rosácea cutânea. A MMP-2 ainda não foi descrita associada à rosácea.<sup>11,27</sup>

Indiretamente, uma evidência da associação das metaloproteinases (MMPs) com a rosácea é a demonstração, *in vitro*, que os antibióticos tetraciclina e doxiciclina, tradicionalmente utilizados no tratamento da rosácea, inibem a ação dessas enzimas. Essa inibição ocorre na fase zimógena, após a elaboração enzimática mitocondrial.<sup>28-32</sup>

Neste estudo se utilizou o método imunistoquímico para avaliar a pele dos pacientes com lesões inflamatórias de rosácea e de pacientes com outras dermatoses inflamatórias (grupo controle), quanto à expressão das gelatinases A e B.

O objetivo principal foi o de verificar se a MMP-2 e a MMP-9 podem ser consideradas participantes no processo patogênico da rosácea cutânea, já que inexistem dados específicos publicados sobre o tema.

Outros objetivos do estudo foram: verificar a existência de associação entre os estágios inflamatórios e/ou variantes inflamatórias da rosácea e a expressão das gelatinases, e avaliar a ocorrência de uma correlação inversa entre os fototipos cutâneos dos pacientes com rosácea e a expressão das metaloproteinases-2 e -9.

## **Material e Métodos**

Nos Serviços de Dermatologia e de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil) um estudo de casos e controles foi delineado e foram incluídos pacientes de ambos os sexos e acima de 18 anos.

Os casos eram pacientes portadores de rosácea na face em estágios II e III ou com alguma forma especial com processo inflamatório sobreposto, seguindo a classificação de Plewig e Kligman<sup>1</sup>. De acordo com a classificação da *National Rosacea Society* (Estados Unidos da América do Norte)<sup>2</sup> seriam os pacientes com o subtipo II de rosácea e/ou com a variante granulomatosa e/ou com o edema central facial (componente do subtipo I). Foram avaliadas também, como variáveis, os fototipos cutâneos, utilizando a classificação de Fitzpatrick<sup>33</sup> e a evidência histopatológica da presença do *Demodex folliculorum*.

Foram excluídos os pacientes menores de 18 anos, as gestantes, os pacientes com rosácea que apresentassem apenas alterações vasculares, os pacientes com as formas especiais de rosácea, esteróide, halogênica e gram-negativa (classificação de Plewig e Kligman), os pacientes que estavam em uso ou haviam usado, nos últimos 30 dias, corticoesteróides, retinóides, imunossupressores, antibióticos, antiinflamatórios não-esteróides e medicamentos com ação antineutrófila, via sistêmica e, nos últimos 7 dias, os mesmos medicamentos, via tópica.

O grupo controle foi constituído por pacientes sem rosácea, mas com outras doenças dermatológicas inflamatórias na face. Foi avaliada, também neste grupo, a presença do *Demodex folliculorum*, à histopatologia. Os mesmos critérios de exclusão foram utilizados.

Com a aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brasil, e o termo de consentimento compreendido e assinado, as variáveis foram coletadas e analisadas.

Foram selecionados 34 pacientes com rosácea (25 incidentes e 9 prevalentes) e 29 pacientes controles (16 incidentes e 13 prevalentes). Após a realização da biópsia da lesão facial com *punch* de 3mm, o material foi fixado em formalina tamponada a 10% por 12 horas.

Após procedimentos de rotina e inclusão em parafina, os espécimes foram seccionados em cortes de 5 micrômetros e avaliados através da histopatologia convencional pelo método de hematoxilina e eosina (H-E).

Com novos cortes de 5 micrômetros, a imunoistoquímica foi realizada de acordo com normatizações validadas em experimentos científicos publicados.<sup>34,35</sup> Foram preparadas lâminas com solução de organossilano, realizada a rehidratação e o bloqueio da peroxidase endógena. A recuperação antigênica foi realizada com o uso do tampão citrato e, após, foram aplicados os anticorpos primários para MMP-2 (Neomarkers Incorporation, Fremont, USA) e MMP-9 (Chemicon International Incorporation, Temecula, USA) e o anticorpo secundário associado ao sistema de amplificação biotina-estreptavidina (DAKO Corporation, Carpinteria, USA), por 30 minutos. Ao final, foi adicionado a solução cromógena diaminobenzidina (DAKO Corporation, Carpinteria, USA) e procedeu-se a 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).

As lâminas de imunoistoquímica foram interpretadas por 4 avaliadores diferentes, que não conheciam a história clínica do paciente. A média das avaliações foi utilizada como resultado final.

Foram utilizados os métodos semi-quantitativo (0, quando nenhuma coloração estava presente; 1+, quando até 25% da estrutura ou tipo celular estavam corados; 2+, quando estavam corados entre 25-75%; 3+, quando mais que 75% estavam corados) e qualitativo (coloração intensa, moderada ou fraca), adaptados de métodos descritos na literatura corrente.<sup>34,35</sup> A intensidade da coloração, para fins de análise estatística, foi codificada pela escala 0= sem coloração, fraca= 1+, moderada= 2+ e intensa= 3+.

A expressão das MMPs foi avaliada nos queratinócitos, nos histiócitos (monócitos e macrófagos), nos fibroblastos, na unidade pilar, nas células endoteliais e na matriz extracelular.

Os dados foram avaliados estatisticamente pelos teste de Mann-Whitney (MW), sendo o  $p < 0,05$  considerado como significativo. A correlação linear entre variáveis foi analisada pela correlação de Spearman. Os dados foram analisados através do *software* SPSS, versão 11.

## **Resultados**

Dos 63 pacientes, 42 (66,7%) eram mulheres e 21 (33,3%) eram homens. A faixa das idades variou dos 19 aos 76 anos, a média dos casos foi de 43,23 anos de idade (desvio padrão de 10,90) e a média dos controles foi de 47 anos de idade (desvio padrão de 14,48). Não houve diferença estatisticamente significativa entre as idades dos dois grupos ( $p = 0,245$ ).

Entre os 34 casos, 20 pacientes (58,8%) estavam no estágio II, 8 pacientes (23,5%) estavam em estágio III, 1 paciente (2,9%) era portador de fima associado ao estágio II e 5 pacientes (14,7%) eram portadores de rosácea granulomatosa. No subtipo 2 (rosácea papulo-pustular) haveria a soma do estágio II e III, perfazendo 28 pacientes da amostragem (82,4%).



Quanto aos fototipos cutâneos dos pacientes com rosácea, havia 13 com fototipo II (38,2%), 18 com fototipo III (52,9%), 1 com fototipo IV (2,9%) e 2 com fototipo V (5,9%).

Entre os 29 controles com dermatoses inflamatórias na face, foram biopsiados 13 pacientes com lúpus eritematoso crônico, 4 com lúpus eritematoso subagudo, 2 com dermatite de contato, 2 com sarcoidose, 2 com fotodermatite e 1 com cada uma das seguintes dermatoses: infiltrado linfocítico de Jessner, dermatite exfoliativa, erupção polimorfa solar, dermatite seborréica, dermatomiosite e prurigo actínico.

Nos casos de rosácea, a histopatologia por H-E demonstrou em 12 biópsias a presença do *Demodex folliculorum* (35,3%) e em 22 a ausência do ácaro (64,7%). Verificou-se em 2 controles a presença do *Demodex folliculorum* (6,9%) e em 27 pacientes a ausência do mesmo (93,1%). A diferença entre casos e controles para a presença do *Df* foi estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ).

Em relação à expressão imunoistoquímica da MMP-2, entre os tipos celulares e estruturas avaliadas, foram negativos (ou, = 0) os queratinócitos, em 2 casos e 3 controles (8,6% da amostra geral); os fibroblastos, em 1 caso (1,6% da amostra geral); a matriz extracelular, em 21 casos e 22 controles (74,1% da amostra geral); a unidade pilar, em 1 controle (1,8% da amostra geral); e as células endoteliais, em 2 casos e 1 controle (5,2% da amostra geral). Nos demais casos e controles todos os tipos celulares e estruturas foram positivos para a presença da MMP-2 (tabela 1).

Quanto à positividade na quantificação (1+, 2+ e 3+) e na intensidade da coloração da MMP-2, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas para qualquer tipo celular ou estrutura analisada quando comparados os grupos de casos e controles (para todos os parâmetros,  $p > 0,05$ , pelo teste de MW).

Em relação à expressão imunohistoquímica da MMP-9, entre os tipos celulares e estruturas avaliadas, foram negativos (ou, = 0) os queratinócitos, em 1 caso e 3 controles (6,6% da amostra geral); os histiócitos, em 1 controle (1,6% da amostra geral); os fibroblastos, em 2 casos e 2 controles (6,6% da amostra geral); a matriz extracelular, em 16 casos e 23 controles (63,9% da amostra geral); a unidade pilar em 2 casos e 3 controles, (8,5% da amostra geral); e as células endoteliais em 3 casos e 3 controles (9,8% da amostra geral). Nos demais casos e controles todos os tipos celulares e estruturas foram positivos para a presença da MMP-9 (tabela 2).

Quanto à positividade na quantificação (1+, 2+ e 3+) e na intensidade da coloração, a MMP-9 esteve com presença significativamente maior nos casos de rosácea quanto aos seguintes parâmetros: A) Histiócitos: casos de rosácea - média de positividade= 2,39 e mediana= 2; controles - média de positividade= 1,86 e mediana= 2; com  $p < 0,01$ . A intensidade da coloração foi moderada entre os histiócitos dos casos e de fraca à moderada nos controles, com  $p < 0,01$ . B) Matriz extracelular: casos de rosácea - média de positividade= 0,58 e mediana= 1; controles - média da positividade= 0,25 e mediana= 0, com  $p < 0,01$ . A intensidade da coloração foi fraca na matriz extracelular dos casos e muito fraca nos controles, com  $p < 0,01$ . C) Fibroblastos: casos de rosácea - média de positividade= 2,03 e mediana= 2; controles - média da positividade= 1,61 e mediana= 2, com  $p = 0,05$ . A intensidade da coloração foi fraca à moderada em ambos os grupos, não havendo diferença estatística significativa. D) Queratinócitos: a intensidade da coloração foi moderada nos casos e fraca nos controles, com  $p = 0,02$ . Não houve diferenças na análise semi-quantitativa entre os grupos.

A análise semi-quantitativa e qualitativa da expressão da MMP-9 nos demais tipos celulares e estruturas não demonstrou diferenças significativas entre os dois grupos ( $p > 0,05$ ).

As tabelas 1 e 2 demonstram, respectivamente, todos os parâmetros avaliados quanto à expressão quantitativa e qualitativa da MMP-2 e da MMP-9, nos casos e controles, com a média, o desvio padrão, a mediana e os valores mínimos e máximos, além das análises de significância realizadas pelo teste de Mann-Whitney.

A figura 1 demonstra a positividade 1+ e fraca nos queratinócitos em paciente controle, à expressão da MMP-9; a figura 2 demonstra a positividade 3+ e intensa nos queratinócitos em paciente com rosácea, à expressão de MMP-9; a figura 3 demonstra a positividade 3+ e intensa em fibroblastos de paciente controle, à expressão da MMP-2 e a figura 4 demonstra a positividade 2+ e moderada nos histiócitos e nas áreas adjacentes da matriz, em paciente com rosácea, à expressão de MMP-9.

Quanto à associação entre os estágios clínicos da rosácea e o grau de positividade e intensidade da expressão imunohistoquímica da MMP-2 e da MMP-9, não foi possível detectar diferenças estatisticamente significativas ( $p > 0,05$ ). Igualmente, utilizando a correlação de Spearman ( $r_s$ ), não foram detectadas correlações entre os fototipos cutâneos quanto à expressividade das metaloproteinases em estudo ( $r_s > -0,3$  e  $r_s < +0,3$ ).

## **Discussão**

Neste estudo demonstrou-se *in vivo* a presença significativa na rosácea inflamatória da MMP-9, nos histiócitos e na matriz extracelular, quando comparados aos pacientes controles ( $p < 0,01$ ). Além disso, os demais tipos celulares e estruturas avaliadas também demonstraram que com freqüência expressam as metaloproteinases -2 e -9, porém sem diferenças estatísticas significativas entre os grupos (tabelas 1 e 2). Os fibroblastos demonstraram uma maior freqüência de

positividade entre os casos de rosácea para a expressão da MMP-9, ainda que com uma diferença estatística sem atingir a significância, mas no limite ( $p= 0,05$ ).

A expressão imunoistoquímica da MMP-2 ocorreu de forma freqüente, porém pouco preferencial entre os tipos celulares e estruturas avaliadas em casos e controles. Não foram detectadas diferenças estatisticamente significativas quanto à expressão da gelatinase A, entre os dois grupos, quanto às análises semi-quantitativa e qualitativa empregadas no estudo.

Esses achados são compatíveis com pesquisas que demonstram ser a MMP-2 uma enzima de mais ampla distribuição entre várias doenças (dermatológicas e de outras origens) e, inclusive, podendo ser encontrada em peles normais, já que possui importante função no remodelamento fisiológico do tecido conjuntivo dérmico.<sup>36-40</sup>

Desta forma, parece ser verdadeiro que a MMP-2 é uma enzima que não possui ação sempre deletéria, mas que pode exercer atividades patogênicas em determinados contextos, e que possui um espectro de ações amplo, pois já foi encontrada na psoríase, no líquen plano, na necrólise epidérmica tóxica, nas fases finais de cicatrização das úlceras cutâneas, nos quelóides e nas cicatrizes hipertróficas e em determinadas neoplasias cutâneas.<sup>12,13,14,37,41-47</sup>

Já a MMP-9, que é uma enzima estimulada por muitos fatores extra-fisiológicos, entre os quais a radiação ultravioleta e infecções, parece exercer atividades com maior capacidade patogênica a curto prazo.<sup>49,50,51</sup> Na pele, já foi associada ao processo de fotodano cutâneo agudo, à psoríase, à anetodermia e ao penfigóide bolhoso, entre outras dermatoses.<sup>12,13,14,41,48,49,52,53</sup>

A MMP-9 é principalmente elaborada por queratinócitos e células inflamatórias, em particular, neutrófilos e histiócitos. Os fibroblastos, as células endoteliais e as glândulas sebáceas e écrinas também podem participar de determinados processos patogênicos, elaborando essa metaloproteinase.<sup>16,17,19,54</sup>

É reconhecido que o eixo regulatório das MMPs envolve a) o estímulo biológico inicial para a secreção de citocinas, como a interleucina-1 e o fator de necrose tumoral alfa, e de fatores de crescimento, como o fator de crescimento transformador beta; b) a ativação das formas zimogênicas das MMPs através das metaloproteinases da matriz tipo membrana (MT-MMP); c) a interação entre as células do epiderma e do derma e entre a matriz extracelular e essas células; e d) a presença dos inibidores teciduais das metaloproteinases (TIMPs).<sup>36,55</sup>

Utilizando o esquema proposto por Fischer *et al.*, em 1997,<sup>56</sup> para explicar a influência dos raios ultravioletas (fator extra-fisiológico) na secreção das metaloproteinases, o esquema hipotético para etiopatogenia da rosácea defendido por Bamford, em 2001,<sup>57</sup> e considerando o eixo regulatório descrito acima, a rosácea poderia ser resultante de estímulos freqüentes (radiação ultravioleta e fatores biológicos internos, como a elaboração de mediadores causadores de vasodilatação e inflamação) sobre as células elaboradoras de MMP-9.

A presença excessiva da MMP-9 e não controlada completamente pelo seu inibidor tecidual específico, a glicoproteína de 28 kDa denominada de TIMP-1, permitiria uma ação prolongada da forma ativada da enzima (com 82 kDa) sobre os colágenos tipo IV, V, VII, X e XIV, a elastina, a entactina e outros componentes da matriz extracelular.<sup>36,58,59</sup> Além disso, por suas próprias ações pró-inflamatórias e pelo estímulo à quimiotaxia de células inflamatórias, como os histiócitos e neutrófilos, amplificaria o dano à matriz, aumentando a sua desestruturação, o que ocasionaria uma incapacidade linfática de remoção dos fluidos extravasados para o interstício após os episódios de vasodilatação temporária tipo *flushing* e diminuiria a sustentabilidade arquitetural da rede vascular dérmica, facilitando a formação permanente de vasos ectásicos.<sup>6,15,16,36</sup>

Nesse estudo, a expressão semi-quantitativa e qualitativa diferenciada da MMP-9 ocorreu nos histiócitos dos casos ( $p < 0,01$ ). Essas células são consideradas

habitualmente “células residentes” do derma, mas estavam presentes em grande quantidade nos processos inflamatórios visualizados nos casos de rosácea.

Na matriz extracelular pouca expressão foi visualizada. A adjacência às células secretoras das MMPs apenas eventualmente é corada pelas técnicas de imunistoquímica,<sup>45,46,47,60</sup> ainda que Keski-Oja *et al.* tenham demonstrado que as gelatinases não somente são secretadas por fibroblastos, mas se depositam ao redor dessas células, em área estromal, sob forma zimogênica e ativada.<sup>21</sup> Ainda assim, nos pacientes com rosácea, houve maior expressão quantitativa e qualitativa da MMP-9, quando comparado aos controles, com significância estatística ( $p < 0,01$ ). Estudos com observações semelhantes foram publicados na rosácea ocular.<sup>11,27</sup>

Em conclusão, mesmo que esses achados se constituam em uma evidência de um possível papel da MMP-9 na patogênese da rosácea inflamatória (estágio II, III e variante granulomatosa), estudos utilizando outros métodos, como a zimografia, poderão atestar o grau de atividade dessa gelatinase na pele dos pacientes.

Quanto à MMP-2, apesar de não ter sido demonstrado ser um mediador característico da rosácea inflamatória, pode igualmente contribuir para a sua patogênese, pois na maioria dos casos de rosácea essa enzima estava presente.

Além de auxiliar na compreensão parcial da patogênese da rosácea inflamatória, esses dados podem ajudar a corroborar biologicamente o uso de alguns medicamentos tradicionais no tratamento da rosácea, como a tetraciclina e a doxiciclina, que possuem ação inibitória sobre as MMPs.<sup>6,28-30</sup>

Outros inibidores sintéticos das MMPs já estão sendo testados experimentalmente para doenças fortemente mediadas por essas enzimas.<sup>61,62</sup> A rosácea talvez possa ser incluída nessa lista.

## **Agradecimentos**

Agradecemos à bióloga Ivana Höfke de Souza Gallota e à Dra. Andréa Rodrigues C. Pires pelo auxílio na execução e interpretação inicial da imunistoquímica. Agradecemos ao professor Dr. Mário Wagner, pelo apoio bioestatístico. Agradecemos ao Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE) e à Fundação Médica do Rio Grande do Sul pelo auxílio financeiro viabilizador desse estudo.

## Referências

1. PLEWIG G, KLIGMAN AM. Rosacea. In: PLEWIG G, KLIGMAN AM. Acne and rosacea. 3<sup>rd</sup> ed. Berlin: Springer-Verlag; 2000. p. 456-501.
2. WILKIN J, DAHL M, DETMAR M, DRAKE L, FEINSTEIN A, ODOM R, POWELL F. Standard classification of rosacea: report of the National Rosacea Society expert committee on the classification and staging of rosacea. *J Am Acad Dermatol* 2002;46:584-7.
3. ZUBER TJ. Rosacea. *Dermatology* 2000; 27: 309-318.
4. COHEN CG, KRAHN L, WISE TN, EPSTEIN S, ROSS R. Desiluions of disfigurement in a woman with acne rosacea. *Gen Hosp Psychiatry* 1991; 13:273-7.
5. REBORA A. Rosacea. *J Invest Dermatol* 1987 88; Suppl 1:56-60.
6. WILKIN JK. Rosacea. *Pathophysiology and treatment*. Arch Dermatol 1994;130: 359-62.
7. NEUMANN E, FRITZH A. Capillaropathy and capillaroneogenesis in the pathogenesis of rosacea. *Int J Dermatol* 1998;37:263-6.
8. THIBOUTOT DM. Acne Rosacea. *Am Fam Physician* 1994;50:1691-7.
9. GREAVES MW. Flushing and Flushing Syndromes, Rosacea and Perioral Dermatitis. In: Champion RH, Burton JL, Burns DA, Breathnach SM, editors. Rook/Wilkinson/Ebling Textbook of Dermatology. 6th ed. Oxford: Blackwell Science; 1998. p.2099-2112.
10. HAN YP, TUAN TL, WU H, HUGES M, GARNER WL. TNF-alpha stimulates activation of pro-MMP-2 in human skin through NF-(kappa) B mediated induction of MT1-MMP. *J Cell Sci* 2001; 114:131-39.
11. AFONSO AA, SOBRIN L, MONROY DC, SELZER M, LOKESSHAWAR B, PFLUGFELDERP SC. Tear fluid gelatinase B activity correlates with IL-1 alpha



concentration and fluorescein clearance in ocular rosacea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40: 2506-12.

12. FELICIANI C, VITULLO P, D'ORAZI G, PALMIROTTA R, AMERIO P, MOHAMMAD PS, *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: 321-7.

13. SUOMELA S, KARINIEMI AL, SNELLMAN E, SAARIALHO-KERE U. Metalloelastase (MMP-12) and 92-kDa gelatinase (MMP-9) as well as their inhibitors, TIMP-1 and -3 are expressed in psoriatic lesions. *Exp Dermatol* 2001;10:175-83.

14. GIANNELLI G, BRASSARD J, FOTI C, STLETER-STEVENSON WG, FALK-MARZILLIER J, ZAMBONIN-ZALONE A, *et al.* Altered Expression of Basement Membrane Proteins and Their Integrins Receptors in Lichen Planus: Possible Pathogenetic Role of Gelatinases A and B. *Laboratory Inv* 1996;74: 1091-1104.

15. SELTZER JL, ADAMS AS, GRANT GA, EISEN AZ. Purification and properties of a gelatin-specific neutral protease from human skin. *J Sci Biol Chem* 1981;256: 4662-8.

16. COLLIER IE, WILHELM SM, EISEN AZ, MARMER BL, GRANT GA, SELTZER JL, *et al.* H-ras oncogen-transformed human bronchial epithelial cells (TBE-1) secrete a single metalloproteinase capable of degrading basement membrane collagen. *J Biol Chem* 1988;263:6579-87.

17. COLLIER IE, BRUNS GA, GOLDBERG GI, GERHARD DS. On the structure and chromosome location of the 72- and 92-kDa human type IV collagenase genes. *Genomics* 1991;9: 429-34.

18. MAILLARD JL, FAVREAU C, REBOUD RM. Role of monocyte/macrophage derived matrix-metaloproteinases (gelatinases) in prolonged skin inflammation. *Clin Chim Acta* 1995;233:61-74.

19. KANBE N, TANAKA A, KANBE M, ITAKURA A, KUROSAWA M, MATSUDA H. Human mast cells produce matrix metalloproteinase 9. *Eur J Immunol* 1999;29:2645-9.
20. LI L, AKERS K, EISEN A, SELTZER JL. Activation of gelatinase A (72-kDa collagenase) induced by monensin in normal human fibroblasts. *Exp Cell Res* 1997;232: 322-30.
21. 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: 1167-77.
22. AMANO S, AKUTSU N, NISHIMA T, CHAMPLIAUD MF, BURGESSON RE, ADACHI E. Importance of balance between matrix synthesis and degradation in basement membrane formation. *Exp Cell Res* 2001;271:249-62.
23. HAN YP, TUAN TL, HUGES M, GARNER WL. Transforming growth factor-beta and tumor necrosis factor-alpha-mediated induction and proteolytic activation of MMP-9 human skin. *J Biol Chem* 2001;276:22341-50.
24. BERANGER JY, GODEAU G, FRANCES C, ROBERT L, HORNEBECK W. Presence of gelatinase A and metalloelastase type protease at the plasma membrane of human skin fibroblasts. Influence of cytokines and growth factors on cell-associated metalloendopeptidase levels. *Cell Biol Int* 1994;18:715-22.
25. KESKI-OJA, LOHI J, TUTILA A, TRYGUASON K, VARTIO T. Proteolytic processing of the 72.000-Da type IV collagenase by urokinase plasminogen activator. *Exp Cell Res* 1992;202:471-6.
26. WONG WR, KOSSODO S, KOICHEVAR IE. Influence of cytokines on matrix metalloproteinases produced by fibroblasts cultured in monolayer and collagen gels. *J Formos Med Assoc* 2001;100:377-82.

27. SOBRIN L, LIU Z, MONROY DC, SOLOMON A, SELZER MG, LOKESHWAR BL, *et al.* Regulation of MMP-9 activity in human tear fluid end corneal epithelial culture supernatant. *Inv Ophthalmol Vis Science* 2000;41:1703-09.
28. RUBINS JB, CHARBONEAU D, ALTER MD, BITTERMAN PB, KRATTZKE RA. Inhibition of mesothelioma cell growth in vitro by doxycycline. *J Lab Clin Med* 2001; 138:101-6.
29. RYAN ME, USMAN A, RAMAMURTHY NS, GOLUB LM, GREENWALD RA. Excessive matrix metalloproteinase activity in diabetes: inhibition by tetracycline analogues with zinc reactivity. *Curr Med Chem* 2001;8:305-16.
30. SAIHAN EM, BURTON JL. A double-blind trial of metronidazole versus oxytetracycline therapy for rosacea. *Br J Dermatol* 1980; 102:443-5.
31. QUATERMAN MJ, JOHNSON DW, ABELE DC, LESHER JL, HULL DS, DAVIS LS. Ocular rosacea. Signs, symptoms, and tear studies before and after treatment with doxycycline. *Arch Dermatol* 1997; 133:89-90.
32. TORRESANI C, PAVESI A, Manara GC. Clarithromycin versus doxycycline in the treatment of rosacea. *Int J Dermatol* 1997; 36:942-6.
33. FITZPATRICK TB, ORTONNE J-P. Normal skin color and general considerations of pigmentary disorders. In: FREEDBERG IM, EISEN AZ, WOLFF K, AUSTEN KF, GOLDSMITH LA, KATZ SI, editors. *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine*. 6<sup>th</sup> edition. New York: McGraw-Hill 2003; p.819-836.
34. BODEY B, BODEY B, SIEGALI SE, KAISER HE. Matrix metalloproteinase expression in malignant melanomas: tumor-extracellular matrix interactions in invasion and metastasis. *In Vivo* 2001;15:57-64.
35. SENTURK N, YILDIZ L, SULLU Y, KANDEMIR B, TURANLI AY. Expression of bcl-2 protein in active skin lesions of Behçet. *Int J Dermatol* 2001;40:747-50.
36. 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. *Dermatology in General Medicine*. 6 ed. New York: McGraw-Hill, 2003 p. 200-209.

37. MAEDA A, SOBEL RA. Matrix metalloproteinases in the normal human central nervous system, microglial nodules, and multiple sclerosis lesions. *J Neuropathol Exp Neurol* 1996;55: 300-09.

38. HUGES PM, WELLS GMA, CLEMENTS JM, GEARING JH, REDFORD EJ, DAVIES M, *et al.* Matrix metalloproteinase expression during experimental autoimmune neuritis. *Brain* 1998;121: 481-94.

39. BROWN PD, BLOXIDGE RE, STUART NSA, GATTER KC, CARMICHAEL J. Association Between expression of Activated 72-Kilodalton Gelatinase and Tumor Spread in Non-Small Cell Lung Carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1993;85:574-8.

40. TOMINAGA M, MIGITA K, NAKAMURA H, ICHINOSE Y, FURUYA T, ORIGUCHI T, *et al.* Expression of metalloproteinase-2 (gelatinase A) in labial salivary glands of patients with Sjögren syndrome with HTLV-1 infection. *Clin Exp Rheumatol* 1999;17:463-6.

41. PAQUET P, NUSGENS BV, PIÉRARD GE, LAPIÈRE M. Gelatinases in drug-induced toxic epidermal necrolysis. *Eur J Clin Invest* 1998; 28:528-32.

42. YAGER DR, ZHANG LY, LIANG HX, DIEGELMANN RF, COHEN K. Wound fluids from human pressure ulcers contain elevated matrix metalloproteinase levels and activity compared to surgical wound fluids. *J Invest Dermatol* 1996;107: 743-8.

43. COOK H, DAVIES KJ, HARDING KG, THOMAS DW. Defective extracellular matrix reorganization by chronic wound fibroblasts is associated with alterations in TIMP-1, TIMP-2, MMP-2 activity. *J Invest Dermatol* 2000;115:225-33.

44. NEELY AN, CLENDENING CE, GARDNER J, GREENHALGH DG, WARDEN GD. Gelatinase activity in keloids and hypertrophic scars. *Wound Repair and Regeneration* 1999;7: 166-71.

45. TSUKIFUJI R, TAGAWA K, HATAMOCHI A, SHINKAI H. Expression of matrix metalloproteinase-1, -2, -3 in squamous cell carcinoma and actinic keratosis. *Br J Cancer* 1997;80:1087-91.
46. VARANI J, HATTORI Y, SCHMIDT T, PERONE P, ZEIGLER ME, FADER DJ, *et al*. Collagenolytic and gelatinolytic matrix metalloproteinases and their inhibitors in basal cell carcinoma of skin: comparison with normal skin. *Br J Cancer* 2000;82:657-65.
47. VÄISANEN A, TUOMINEN H, KALLIOINEN M, TUPENNIEMI-HUJANEN T. Matrix metalloproteinase-2 (72kDa type Iv collagenase) expression occurs in the early stage of human melanocytic tumour progression and may have prognostic value. *J Pathol* 1996;180:283-89.
48. KOIVUKANGAS V, KALLIOINEN M, AUTIO HH, OIKARINEN A. UV irradiation induces the expression of gelatinases in human skin in vivo. *Acta Derm Venereol* 1994;74:279-82.
49. 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 fibroblast in culture. *Cell Biol Int* 1997;21:347-52.
50. PERIDES G, TANNER-BROWN LM, ESKILDSEN MA, KLEMPNER MS. *Borrelia burgdoferi* induces matrix metalloproteinases by neural cultures. *J Neurosci Res* 1999;58:779-90.
51. MORY N, SATO H, HAYASHIBIRA T, SENBA M, GELAZIUNAS C, WADA A, *et al*. *Helicobacter pylori* induces matrix metalloproteinase-9 through activation of nuclear factor kappa B. *Gastroenterol* 2003;124:983-92.
52. 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;24:118-29.

53. VENENCIE PY, BONNEFOY A, GOGLY B, KUT C, PELLAT B, HORNEBECK W, *et al.* Increased expression of gelatinases A and B skin explants from patients with anetoderma. *Br J Dermatol* 1997;137:517-25.
54. 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;273:5400-04.
55. PENDAS AM, MATILLA T, ESTIVIL X, LÓPEZ-OTIN C. The human collagenase-3 (CLG-3) gene is located on chromosome 11q22.3 clustered to other members of the matrix metalloproteinase gene family. *Genomics* 1995;10: 615.
56. FISHER GJ, WANG Z, DATTA SC, VERANI J, KANG S, VOORHEES JJ. Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light. *N Eng J Med* 1997;337:1419-28.
57. BAMFORD JT. Rosacea: current thoughts on origin. *Semin Cutan Med Surg* 2001;20:199-206.
58. GOMÉZ DE, ALONSO DF, YOSHIJI H, THORGEIRSSON UP. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol* 1997;74:111-22.
59. SUGITA Y, MORITA E, TANAKA T, NAKAMURA K, YAMAMOTO S. Production of tissue inhibitor of metalloproteinase -1 and -2 by cultured keratinocytes. *J Dermatol Sci* 2000;22:107-16.
60. THEWES M, WORET WI, ENGST R, RING J. Stromelysin-3 (ST-3): immunohistochemical characterization of the matrix metalloproteinase (MMP)-11 in benign and malignant skin tumours and other skin disorders. *Clin Exp Dermatol* 1999;24:122-6.
61. LEVITT NC, ESKENS FA, O'BYRNE KJ, PROPPER DJ, DENIS LJ, OWEN SJ, *et al.* Phase I and pharmacological study of the oral matrix metalloproteinase inhibitor,

MMI270 (CGS27023A), in patients with advanced solid cancer. *Clin Cancer Res* 2001;7:1912-22.

62. SAWA M, TSUKAMOTO T, KIYOI T, KUROKAWA K, NAKAJIMA F, NAKADA Y, *et al.* New strategy for antedrug application: development of metalloproteinase inhibitors as antipsoriatic drugs. *J Med Chem* 2002;45:930-6.

**Tabela 1** – Análise semi-quantitativa e qualitativa da MMP-2 em casos e controles.

MMP 2	Casos de Rosacea n=34					Controles n=29					p MW
	Média	Desvio padrão	Mediana	Mínimo	Máximo	Média	Desvio padrão	Mediana	Mínimo	Máximo	
Epi Q	2,09	1,00	2,00	0,00	3,00	2,08	1,06	2,00	0,00	3,00	0,99
Epi q	1,50	0,72	1,50	0,00	3,00	1,46	0,86	1,00	0,00	3,00	0,81
H Q	1,88	0,79	2,00	1,00	3,00	1,73	0,72	2,00	1,00	3,00	0,50
H q	1,47	0,57	1,00	1,00	3,00	1,50	0,51	1,50	1,00	2,00	0,73
Fib Q	1,88	0,79	2,00	0,00	3,00	1,77	0,82	2,00	1,00	3,00	0,52
Fib q	1,66	0,79	2,00	0,00	3,00	1,58	0,58	2,00	1,00	3,00	0,76
Mtz Q	0,38	0,55	,00	0,00	2,00	0,15	0,37	,00	0,00	1,00	0,10
Mtz q	0,44	0,67	,00	0,00	2,00	0,15	0,37	,00	0,00	1,00	0,08
Up Q	2,16	0,86	2,00	1,00	3,00	2,13	0,95	2,00	0,00	3,00	0,96
Up q	1,65	0,61	2,00	1,00	3,00	1,57	0,66	2,00	0,00	3,00	0,75
En Q	1,69	0,82	2,00	0,00	3,00	1,62	0,80	1,50	0,00	3,00	0,65
En q	1,34	0,65	1,00	0,00	3,00	1,38	0,57	1,00	0,00	2,00	0,73

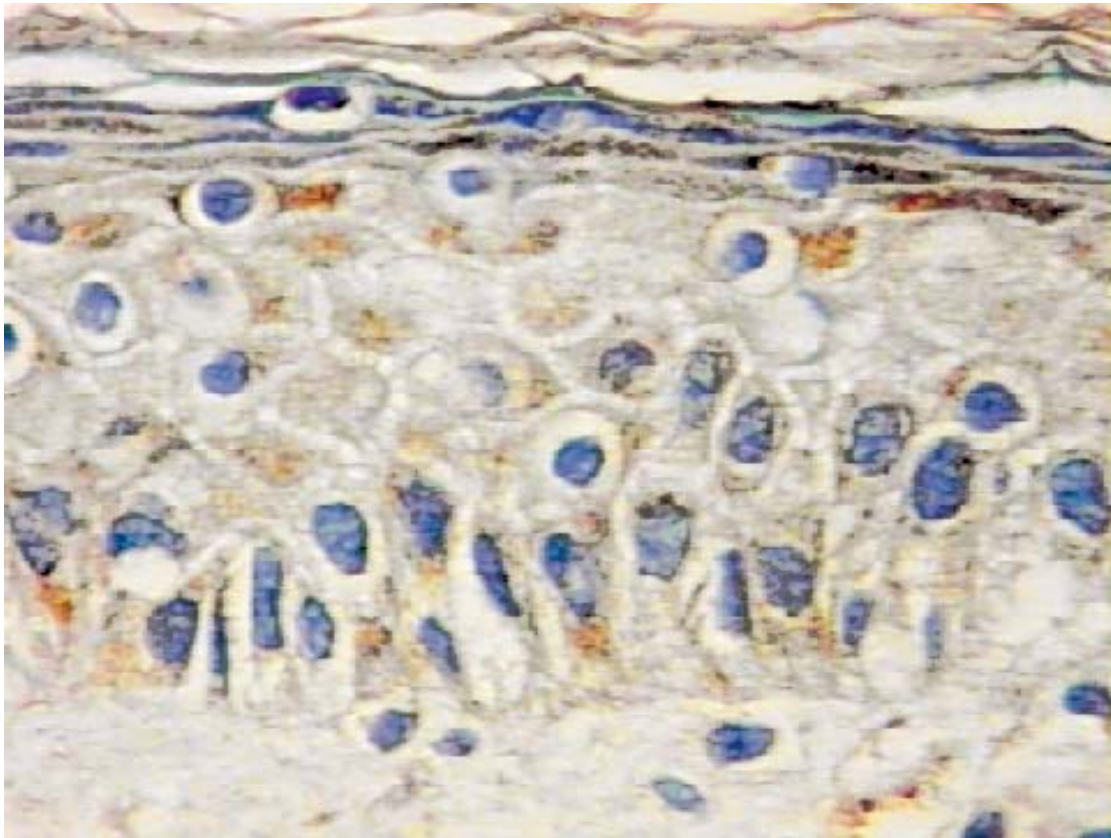
*MMP-2: metaloproteinase-2 da matriz; Q: quantitativo; q: qualitativo; Epi: epiderma; H: histiócitos; Fib: fibroblastos; Mtz: matriz; Up: unidade pilar; En: endotélio; MW: Mann-Whitney*



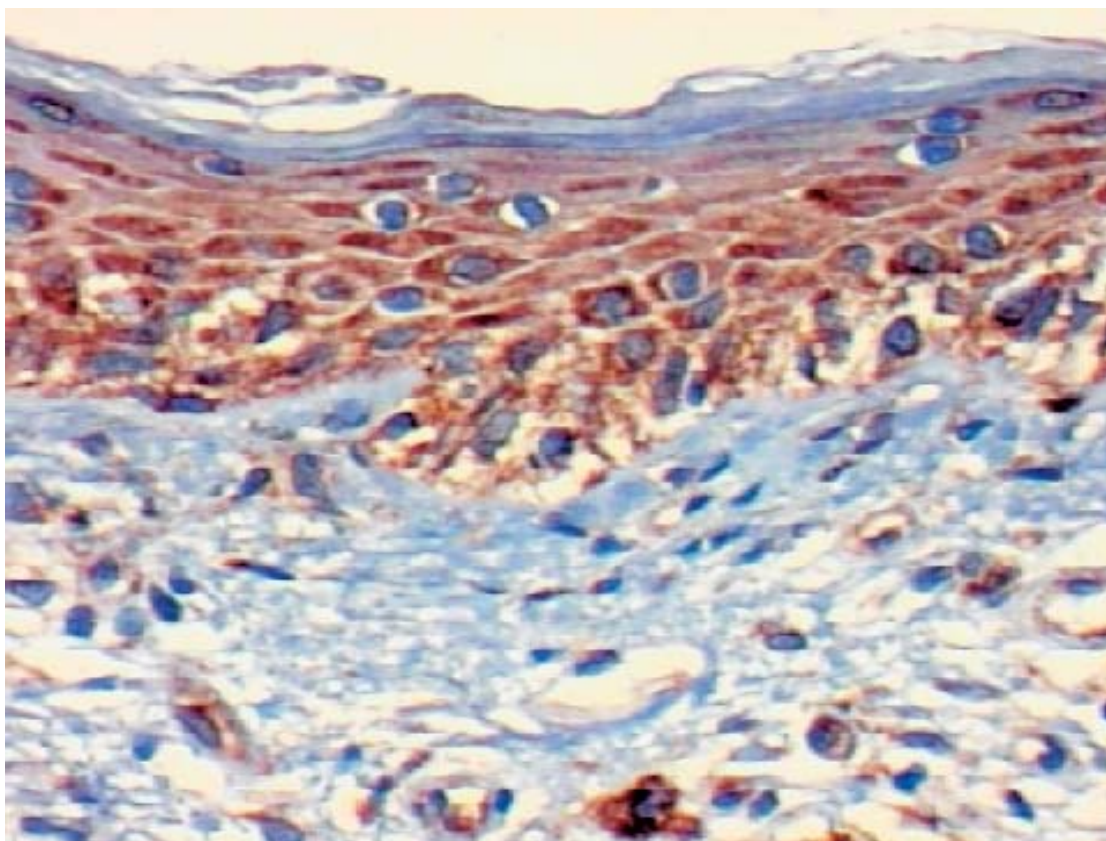
**Tabela 2** – Análise semi-quantitativa e qualitativa da MMP-9 em casos e controles.

MMP 9	Casos of Rosácea n=34					Controles n=29					p MW
	Média	Desvio padrão	Mediana	Mínimo	Máximo	Média	Desvio padrão	Mediana	Mínimo	Máximo	
Epi Q	2,15	0,83	2,00	0,00	3,00	1,75	0,93	2,00	0,00	3,00	0,09
Epi q	1,85	0,76	2,00	0,00	3,00	1,36	0,78	1,00	0,00	3,00	0,02
H Q	2,39	0,61	2,00	1,00	3,00	1,36	0,80	2,00	0,00	3,00	0,01
H q	2,00	0,56	2,00	1,00	3,00	1,54	0,69	1,50	0,00	3,00	0,04
Fib Q	2,03	0,88	2,00	0,00	3,00	1,61	0,83	2,00	0,00	3,00	0,05
Fib q	1,70	0,68	2,00	0,00	3,00	1,43	0,69	1,00	0,00	3,00	0,09
Mtz Q	0,58	0,61	1,00	0,00	2,00	0,25	0,59	0,00	,00	2,00	0,01
Mtz q	0,70	0,77	1,00	0,00	2,00	0,25	0,59	0,00	0,00	2,00	0,01
Up Q	2,21	0,86	2,00	0,00	3,00	2,00	0,98	2,00	0,00	3,00	0,42
Up q	1,85	0,80	2,00	0,00	3,00	1,58	0,76	2,00	0,00	3,00	0,20
En Q	1,79	0,93	2,00	0,00	3,00	1,61	0,99	1,00	0,00	3,00	0,42
En q	1,55	0,83	2,00	0,00	3,00	1,29	0,71	1,00	0,00	3,00	0,20

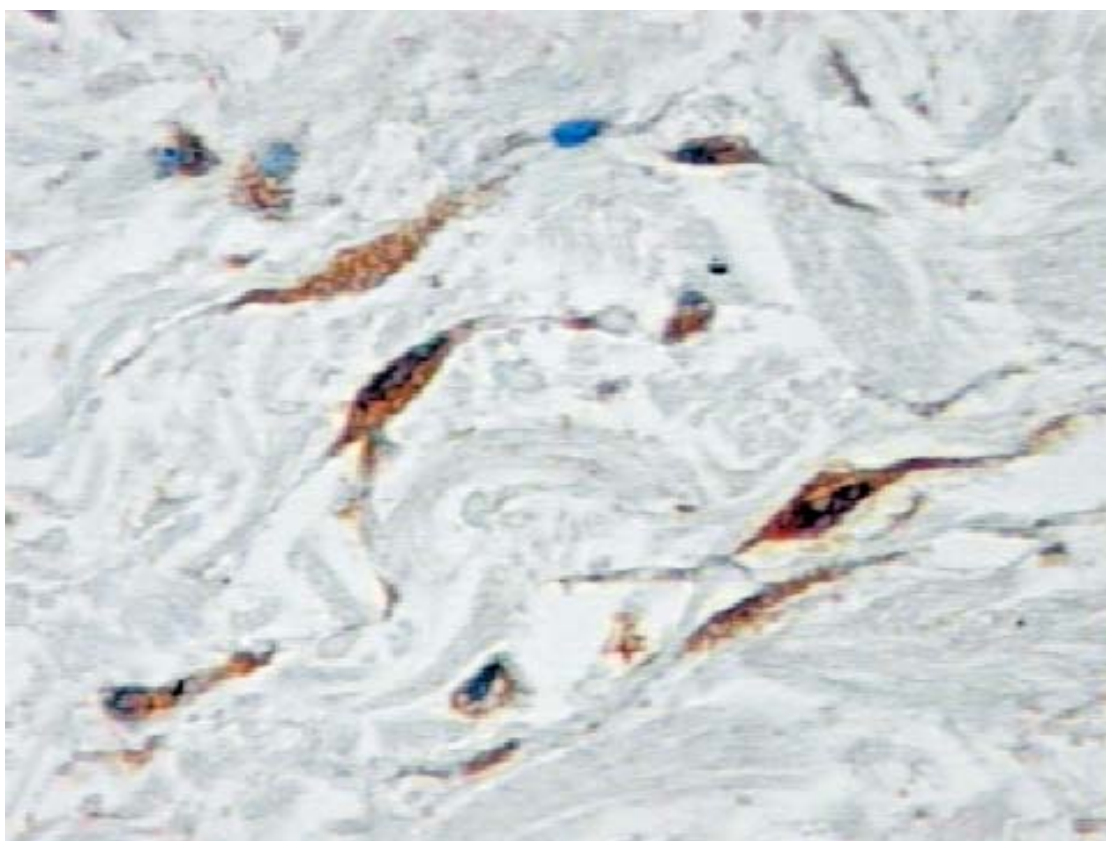
MMP-9: metaloproteinase-2 da matriz; Q: quantitativo; q: qualitativo; Epi: epiderma; H: histiócitos; Fib: fibroblastos; Mtz: matriz; Up: unidade pilar; En: endotélio; MW: Mann-Whitney.



**Figura 1** – Expressão da MMP-9 em paciente controle: **1+** e **fraca** em queratinócitos (imunoperoxidase-DAB, x 400, no original)

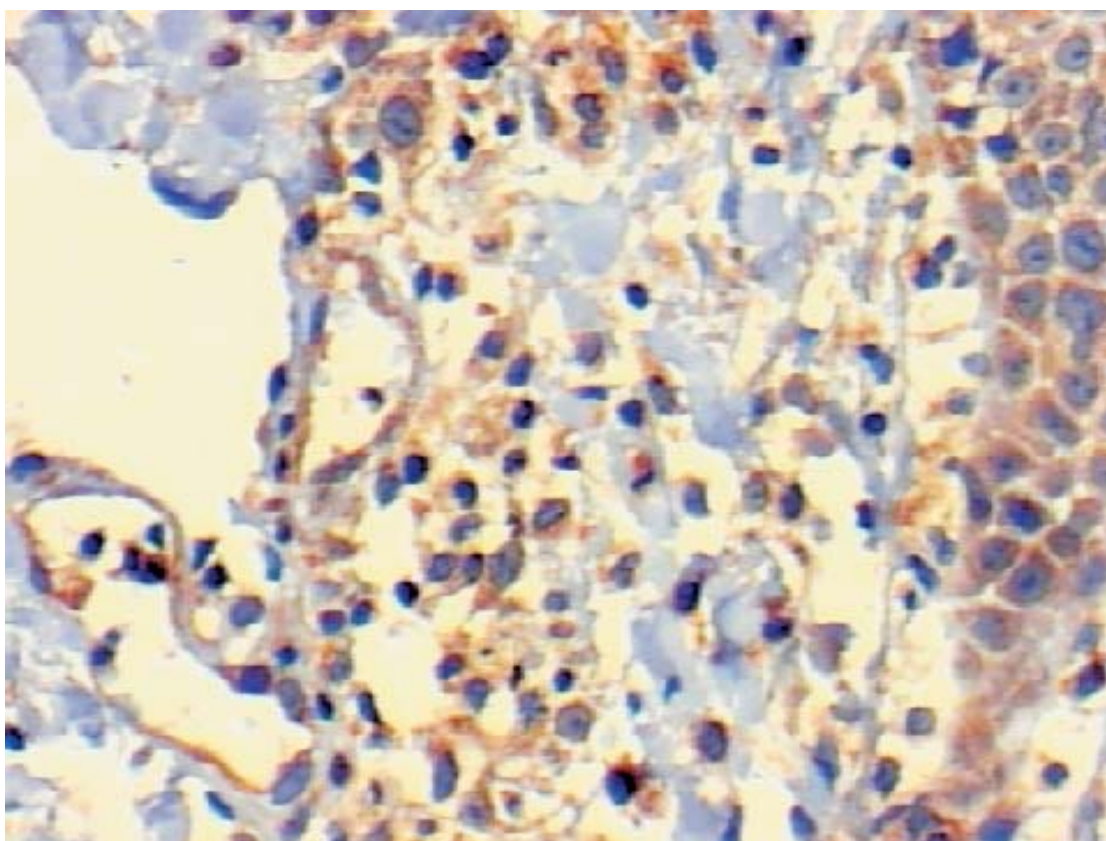


**Figura 2** - Expressão da MMP-9 em paciente com rosácea: **3+** e **intensa** em queratinócitos (imunoperoxidase-DAB, x 250, no original)



**Figura 3** – Expressão da MMP-2 em paciente controle: **3+** e **intensa** em fibroblastos (imunoperoxidase-DAB, x 400, no original)





**Figura 4** – Expressão da MMP-9 em paciente com rosácea: **2+** e **moderada** em histiócitos e área adjacente (imunoperoxidase-DAB, x 250, no original)

**5.3. Artigo 2: *Demodex folliculorum* and metalloproteinases-2 and -9 expression in inflammatory rosacea**

**Authors**

Renan Rangel Bonamigo, Lucio Bakos, Maria Isabel Albano Edelweiss, André Cartell.

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

**Correspondence**

Renan Rangel Bonamigo – Rua Dr. Vale 605 / 401B, CEP 90560-010, Porto Alegre, RS, Brazil. Phone:+55.51.33467209; Fax:+55.51.33467209; e-mail: [rbona@portoweb.com.br](mailto:rbona@portoweb.com.br)

## Abstract

**Background:** *Demodex folliculorum* (*Df*) may participate as a pathogenic co-factor in rosacea. Among the regulatory actions of matrix metalloproteinases –2 and -9 (MMP-2 and MMP-9) are the denaturation of collagen and participation in inflammatory processes. These metalloproteinases have been implicated as participants in the pathogenesis of certain dermatological diseases, and others with a different source, including infectious ones. MMP-9 has already been evaluated as important for the development of the clinical picture in ocular rosacea. The present study evaluated the association and correlation between the presence of *Df* and the expression of MMP-2 and MMP-9 in cases of rosacea. The distribution of *Df* was examined as to stages and special forms of rosacea.

**Methods:** a cross-sectional study was performed involving 34 patients with rosacea having an inflammatory component (25 incident cases and 9 prevalent ones). The following were evaluated: age, sex, cutaneous phototype, stage or special clinical forms, the presence of *Demodex folliculorum* in cutaneous histopathology and the immunohistochemical expression of MMP-2 and MMP-9 using the semi-quantitative and qualitative methods. The expected associations and correlation were evaluated using chi-square test ( $p < 0.05$ ) and the Spearman correlation.

**Results:** mean age was 43.2 years, 20 patients (58.8%) were female and 24 (42.2%) male. Phototypes II and III were 91.1% of the sample. Stages II and III were 82.4% of the sample. *Df* was present in 12 cases (35.3%) of the sample analyzed. No differentiated distribution of *Df* was detected among the stages and special forms of inflammatory rosacea. MMP-2 expression was not significantly different between patients with rosacea or without *Demodex folliculorum*. No linear correlation was found between the presence of *Df* and the degree of positivity and intensity for MMP-2 expression. MMP-9 expression was statistically greater in fibroblasts in the

cases of rosacea when *Df* was presented as compared to the cases of rosacea without *Df* ( $p= 0.035$ ). A linear correlation was found between the presence of *Df* and the degree of positivity for MMP-9 expression in the fibroblasts of patients with inflammatory rosacea ( $r_s > +0.3$ ).

**Conclusions:** considering recognized pathogenic actions and the association and correlation found in the present study, it is concluded that MMP-9 may constitute a pathogenic mediator in certain cases of inflammatory rosacea, particularly in those in whom *Demodex folliculorum* is present.

**Key words:** metalloproteinases, gelatinases; *Demodex folliculorum*, rosacea



## Introduction

A broad set of provoking and aggravating factors is related to the development of rosacea, such as ultraviolet radiation, psychological disorders, use of vasodilating medication and other vasodilating substances ingested, high temperatures of food, infectious processes (*Helicobacter pylori*) and diseases that release mediators causing vasodilation and/or inflammation.<sup>1-14</sup>

*Demodex folliculorum* (*Df*) is a commensal mite found in patients with rosacea, inside the follicular infundibulum and in the sebaceous ducts. Rarely it may also be found in an extra-follicular area, amidst the formation of dermal abscesses and associated with the formation of non-caseous epitheloid granulomas of the foreign body type, with the presence of many multinucleated giant cells.<sup>14-17</sup>

However, since *Df* is not always present in rosacea, even in pictures with an intense inflammatory process, and may sometimes be found in other dermatological diseases and in the skin of individuals who do not have dermatosis, its true pathogenic role is still controversial.<sup>15,18,19</sup>

Matrix metalloproteinases (MMPs) are enzymes created by resident cells of the epidermis and dermis, and activated by several factors internal and external to the organism.<sup>20-27</sup> In a situation of excessive secretion of the MMPs and if the latter are not adequately blocked by their specific tissue inhibitors (TIMPs), inflammatory cell activation, angiogenesis and destructuring of the dermal architecture due to collagenolysis may occur.<sup>25, 28, 29</sup>

In recent literature there is a description of studies that found an association between infectious disease and the probably pathogenic presence of metalloproteinase-2 (MMP-2) and metalloproteinase-9 (MMP-9).<sup>30-32</sup>

Thus, in this study, patients with stage II and III rosacea, according to the Plewig and Kligman classification,<sup>15</sup> were evaluated, besides variants with

inflammatory characteristics, for the presence of *Df* and the association of this possible provoking or aggravating factor with the expression of MMP-2 and MMP-9 in certain cells and cutaneous structures of rosacea patients.

### **Material and Methods**

The study was performed in the Dermatology and Pathology Departments of Hospital Clínicas de Porto Alegre (Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil).

Before beginning the research study, the Ethics and Research Committee at Hospital de Clínicas de Porto Alegre approved the study and an informed consent was obtained from the participating patients.

In this cross-sectional study, 34 rosacea cases were evaluated clinically and histopathologically. The inclusion criterion was to have stage II and III facial rosacea, or some special form with a superimposed inflammatory process, according to the classification of Plewig and Kligman.<sup>15</sup> According to the recent classification of the National Rosacea Society (of the United States of America),<sup>33</sup> these would be patients with rosacea subtype II, or with the granulomatous variant or with persistent facial central edema (a component of subtype I).

The variables analyzed were age, sex, cutaneous phototype according to the Fitzpatrick classification,<sup>34</sup> clinical classification of rosacea according to Plewig and Kligman,<sup>15</sup> histopathological evidence of the presence of *Demodex folliculorum* and the immunohistochemical expression of MMP-2 and MMP-9.

The patients excluded were those below the age of 18 years; pregnant women, rosacea patients who presented only vascular changes; patients with special forms of steroid and gram-negative rosacea, according to the classification of Plewig and Kligman; patients who were using or had used, in the last 30 days, steroids,

retinoids, immunosuppressants, antibiotics, non-steroidal anti-inflammatory drugs and medication with antineutrophilic action, systemically and, in the last 7 days, the same medications, topically.

After performing a biopsy of the facial lesion with a 3mm punch, the material was fixed in 10% buffered formalin for 12 hours. Once routine procedures and inclusion in paraffin had been performed, the specimens were cut in 5-micrometer sections and evaluated by conventional histopathology using the hematoxylin and eosin (H-E) method.

The histopathological diagnosis of rosacea and the evidence of the presence of *Df* were established by the set of findings on analyzing the slide, according to the characteristics established in the literature.<sup>15,16,35,36</sup>

Immunohistochemistry was performed with new 5-micrometer sections, according to the standards validated in published scientific experiments.<sup>37,38</sup> Slides were prepared with organosilane solution, rehydration was performed and endogenous peroxidase was blocked. Antigen recovery was performed using citrate buffer and then the primary antibodies for MMP-2 (Neomarkers Incorporation, Fremont, USA) and MMP-9 (Chemicon International Incorporation, Temecula, USA) and the secondary antibody associated to the biotin-streptavidin (DAKO Corporation, Carpinteria, USA) were applied for 30 minutes. Lastly, the chromogenous solution of diaminobenzidine (DAKO Corporation, Carpinteria, USA) was added. Once the antigen recovery had occurred, at all stages washing was previously done with PBS buffer (sodium chloride with monobasic sodium phosphate and dibasic sodium phosphate) (Reagen, Rio de Janeiro, Brazil).

The immunohistochemistry slides were interpreted by 4 different evaluators who did not know the patient's clinical history. The mean of the evaluations was used as a final result.

The semi-quantitative method (0 when there was no staining; 1+ when up to 25% of the structure or cell type were stained; 2+ when between 25-75% were stained; 3+ when over 75% were stained) and qualitative method (intense, moderate or mild staining) adapted from methods described in the current literature.<sup>37,38</sup> The intensity of staining for purposes of statistical analysis was codified by scale 0= no staining, mild= 1+, moderate= 2+ and intense= 3+.

MMP expression was evaluated in the keratinocytes, histiocytes (monocytes and macrophages), fibroblasts, pilar unit, endothelial cells and extracellular matrix.

The data were statistically evaluated using the chi-square test,  $p < 0.05$  being considered significant. The linear correlation between variables was evaluated using the Spearman correlation ( $r_s$ ). The data were analyzed using the SPSS software, version 11.

## Results

Among the 34 patients in the study, age ranged from 19 to 73 years, mean 43.2 years, 20 female (58.8%) and 24 male (41.2%). As to cutaneous phototypes, 13 patients had phototype II (38.2%), 18 phototype III (52.9%), 1 phototype IV (2.9%) and 2 phototype V (5.9%).

Of the 34 cases, 20 patients were in stage II (58.8%), 8 patients were in stage III (23.5%), 1 patient had phyma associated with stage II (2.9%) and 5 patients had granulomatous rosacea (24.7%). In subtype 2 (papulopustular rosacea), stage II and III are added together, making up 28 patients in the sample (82.4%).

Histopathology using H-E showed evidence of the presence of *Demodex folliculorum* in 12 out of 34 biopsies (35.3%). In a case-control study performed concurrently with this one, the histopathological presence of *Df* was seen in 2 out of 29 control patients, without rosacea (6.9%).

Table 1 shows data on patients with inflammatory rosacea as to the variables above. No significant associations were detected analyzing the distribution of *Df* among the stages and special forms of rosacea found in the study. Using statistical analysis no significant association was detected between MMP-2 and the presence of *Df* ( $p > 0.05$ ) in patients with rosacea, for all cell types and structures evaluated. Equally, no correlation was detected between the presence of *Df* and the expression of MMP-2, as to the positivity score and staining intensity.

Concerning the expression of MMP-9 in the fibroblasts, a statistically significant association was found with rosacea, which, in its histopathology shows evidence of the presence of *Df* ( $p = 0.035$ ) (table 2). Equally, there was linear correlation between the presence of *Df* and the positivity index for MMP-9 in the fibroblasts of inflammatory rosacea patients ( $r_s = +0.42$ , with  $p < 0,05$ ). The other cell types and structures evaluated, did not present a statistically significant association.

When the four different levels of intensity of staining were grouped by immunohistochemistry at two levels - absence of staining with mild staining (0 and 1+), and moderate staining with intense staining (2+ and 3+) - it was found that in the keratinocytes there could be a linear correlation between the MMP-9 expression and the levels of intensity ( $r_s = +0.33$ ). The other cell types and structures evaluated did not reach the correlation ( $r_s > +0.3$ ) because some could be close to it (histiocytes,  $r_s = +0.29$ ; pilar unit,  $r_s = +0.29$ ; extracellular matrix:  $r_s = +0.29$ ).

## Discussion

*Demodex folliculorum* is generally found, in small number, in the follicular infundibulum and in the sebaceous ducts, and may occur at all stages of rosacea. Histopathologically, its participation appears to be that of a commensal, but it very probably becomes pathogenic in certain cases, when it is decisive for the

development of demodicidosis, a dermatosis that is independent of rosacea, and that is included in its differential diagnosis.<sup>16,35,39,40</sup>

Regarding, *Df* has already been defined as an aggravating factor, and the use of some topical substances (creams with cosmetics and with steroids, for instance), or the presence of immunodepressant clinical-pharmacological circumstances may favor the multiplication of this mite, transforming it into a relevant secondary agent in certain pictures of rosacea, because of the extensive inflammatory process that it may induce.<sup>14,41</sup>

Rufli & Büchner demonstrated histopathologically, with monoclonal antibodies for T cells, that most of the inflammatory cells that constitute the granulomatous infiltrates related to the presence of *Df* in rosacea are T helper lymphocytes. This finding might provide a foundation to the hypothesis regarding the importance of the immune response mediated by cells in the pathogenesis of rosacea.<sup>16</sup>

Some authors believe that the vascular and dermal connective tissue changes favor the proliferation of *Df*, which may confer sustainability on the pathogenic process of rosacea.<sup>17,42</sup>

Georgala et al. found *Df* in 90.2% of the rosacea patients and in 11.9% of the controls.<sup>17</sup> The difference found was statistically significant ( $p < 0.01$ ). Most of the lymphocytes found in the infiltrates were marked with monoclonal antibodies for CD4 (approximately 90 to 95% of the cells of the infiltrates) and a high number of Langerhans cells and macrophages were found among the cases of rosacea. According to the authors, there is a late hypersensitivity reaction (type IV) to the *Df* antigens in the pathogenesis of rosacea.<sup>17</sup>

El-Shazly et al found a 44% presence of *Df* in rosacea patients and 23% in the controls, and this difference is statistically significant ( $p < 0.05$ ). Including only the patients with papulopustular rosacea, the presence of the mite was 83.3%.<sup>43</sup>

Metalloproteinases–2 and -9 also called gelatinase A and gelatinase B, respectively, have already been identified in association with infections caused by lymphotropic virus of human T cells (HTLV), by *Helicobacter pylori*, by *Borrelia burgdoferi* and by *Mycobacterium leprae*.<sup>30-32,44</sup> Reviewing the literature, up to the present we do not appear to find reports of an association between *Demodex folliculorum* and MMPs. Furthermore, there are studies showing increased MMP-9 expression and activity in ocular rosacea.<sup>27,45</sup>

The present study includes a sample of rosacea patients with a smaller difference between females and males (58.8% and 41.2%, respectively), when compared to the literature.<sup>2,46-48</sup> This detail may have occurred due to the selection of cases (exclusion of erythemato-telangiectatic rosacea, considered in stage I). It is recognized that more severe clinical pictures have a higher frequency in males.<sup>15,46</sup> The frequency of cutaneous phototypes found is similar to those described in the current literature, with predominance of types II and II (which together correspond to 91.1% of the patients with rosacea). The absence of phototype I is interesting.<sup>17,49</sup>

As to the distribution of *Demodex folliculorum* between stages II, III, phyma associated to stage II and granulomatous rosacea, no specific associations were detected, confirming data in the literature that shows the possibility that *Df* may be distributed among all stages of rosacea, although with a higher tendency to be present in cases with a greater inflammatory process.<sup>16,41</sup>

The absence of association and linear correlation between the immunohistochemical expression of MMP-2 and the presence of *Df* may be due to the characteristics of this metalloproteinase, which is secreted widely, even in physiological contexts, for the constant structural remodeling of the dermis.<sup>21,22,50,51</sup> Therefore, it is difficult to distinguish the significance of its presence, since even cutaneous tissues considered normal may express quantities visualized by immunohistochemistry.<sup>20,21,50,51</sup>

Possibly the use of methods that will quantify the degree of MMP activities, such as zymography, may confer levels of comparability on the MMP-2 levels in studies where its expression is diffusely distributed.<sup>52,53</sup>

The high expression in a significant form ( $p < 0.01$ ) of MMP-9 in the fibroblasts of patients with the presence of rosacea and *Df*, and also linear correlation ( $r_s > +0.3$ ) between the presence of *Df* and degree of positivity to the expression of MMP-9 may contribute to the understanding of a part of the rosacea etiopathogeny, since this is a metalloproteinase which a recognized pathogenic potential and may be secreted by fibroblasts, among other cells.<sup>22,54-59</sup> The question is whether a previous factor could stimulate the elaboration and action of MMP-9, which would increase chemotaxis for the inflammatory cells around the mite, or whether the presence of *Df* itself could be the stimulating factor for the elaboration of MMP-9, since the cytokines and growth factors released by the inflammatory process adjacent to *Df* could act on the cells producing MMP-9.<sup>26,45</sup>

The grouping of immunohistochemical staining at two levels of intensity demonstrated the existence of a linear correlation between the presence of *Df* and the intensity of MMP-9 expression in keratinocytes ( $r_s > +0.3$ ). Borderline correlations were detected to reach relevance ( $r_s = +0.29$ ) (which may occur with a larger sample) for the histiocytes, pilar unit, and extracellular matrix. These data corroborate the idea that these other sources elaborating MMP-9 (keratinocytes, pilar unit and histiocytes) may contribute to the pathogenic process of inflammatory rosacea.

Therefore MMPs, MMP-9 in particular, may be a further explanatory link between the presence of *Demodex folliculorum* and clinical expression of certain cases of rosacea.



**Acknowledgements**

We thank biologist Ivana Höfke de Souza Gallota and Dra. Andréa Rodrigues C. Pires for their help in the implementation and initial interpretation of the immunohistochemistry. We thank Prof. Dr. Mário Wagner for biostatistical support. We thank the Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE - Hospital de Clinicas de Porto Alegre ) and Fundação Médica do Rio Grande do Sul for the financial support that made this study possible.

## References

1. SOBYE P. Aetiology and pathogenesis of rosacea. *Acta Dermatol Venereol* 1950;30:137-58.
2. BERG M, LIDÉN S. An epidemiological study of rosacea. *Acta Dermatol Venereol* 1989;69:419-23.
3. JANSEN T, PLEWIG G. Rosacea: classification and treatment. *J R Soc Med* 1997;90:140-50.
4. WILKIN JK. Vasodilator rosacea. *Arch Dermatol* 1980;116:598.
5. WILKIN JK. Rosacea. *Int J Dermatol* 1983;22:393-400.
6. WILKIN JK. Flushing reactions: consequences and mechanisms. *Ann Intern Med* 1981;95:468-76.
7. WILKIN JK. Heat, not caffeine, induces flushing in erythematotelangiectatic rosacea [abstract]. *J Invest Dermatol* 1979;73:310.
8. REICHERT S, TRUCHETET F, CUNY JF, GRANDIDIER M. Tumeur carcinoïde a révélation cutanée. *Ann Dermatol Venerol* 1994;121:485-8.
9. CREAMER JD, WHITTAKER, SJ, GRIFFITHS WAD. Multiple endocrine neoplasia type 1 presenting as rosacea. *Clin Exp Dermatol* 1996;21:170-1.
10. REBORA A, DRAGO F, PICCIOTTO A. *Helicobacter pylori* in patients with rosacea. *Am J Gastroenterol* 1994;89:1603-4.
11. BONAMIGO RR, LEITE CS, WAGNER M, BAKOS L. Rosacea and *Helicobacter pylori*: interference of systemic antibiotic in the study of possible association. *J Eur Acad Dermatol* 2000;14:424-425.
12. NEUMANN E, FRITZ A. Capillaropathy and capillaroneogenesis in the pathogenesis of rosacea. *Int J Dermatol* 1998;37:263-6.
13. COHEN CG, KRAHN L, WISE TN, EPSTEIN S, ROSS R. Desilusions of disfigurement in a woman with acne rosacea. *Gen Hosp Psychiatry* 1991; 13:273-7.

14. BURNS DA. Follicle mites and their role in disease. *Clin Exp Dermatol* 1992;17:152-5.
15. PLEWIG G, KLIGMAN AM. Rosacea. In: *Acne e rosacea*. 3. ed. Berlin: Springer-Verlag; 2000. p. 456-501.
16. RUFLI T, BÜCHNER SA. T-cell subsets in acne rosacea lesions and the possible role of *Demodex folliculorum*. *Dermatologica* 1984;169:1-5.
17. GEORGALA S, KATOULIS AC, KYLAFIS GD, KOUMANTAKI-MATHIOUDAKI E, ARONI K. *Demodex folliculorum* in papulopustular rosacea. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2001;15:441-44.
18. ERBAGCI Z, OZGOZTASI O. The significance of *Demodex folliculorum* density in rosacea. *Int J Dermatol* 1998;134:679.
19. PURCELL SM, HAYES TJ, Dixon SL. Pustular folliculitis associated with *Demodex folliculorum*. *J Am Acad Dermatol* 1986; 15:1159.
20. SELTZER JL, ADAMS AS, GRANT GA, EISEN AZ. Purification and properties of a gelatin-specific neutral protease from human skin. *J Sci Biol Chem* 1981;256: 4662-8.
21. COLLIER IE, WILHELM SM, EISEN AZ, MARMER BL, GRANT GA, SELTZER JL, KRONBERGER A, HE CS, BAUER EA, GOLDBERG GT. H-ras oncogen-transformed human bronchial epithelial cells (TBE-1) secrete a single metalloproteinase capable of degrading basement membrane collagen. *J Biol Chem* 1988;263:6579-87.
22. COLLIER IE, BRUNS GA, GOLDBERG GI, GERHARD DS. On the structure and chromosome location of the 72- and 92-kDa human type IV collagenase genes. *Genomics* 1991;9: 429-34.
23. AMANO S, AKUTSU N, NISHIMA T, CHAMPLIAUD MF, BURGESSON RE, ADACHI E. Importance of balance between matrix synthesis and degradation in basement membrane formation. *Exp Cell Res* 2001;271:249-62.

24. KESKI-OJA, LOHI J, TUUTILA A, TRYGGUASON K, VARTIO T. Proteolytic processing of the 72.000-Da type IV collagenase by urokinase plasminogen activator. *Exp Cell Res* 1992;202:471-6.
25. WONG WR, KOSSODO S, KOCHEVAR IE. Influence of cytokines on matrix metalloproteinases produced by fibroblasts cultured in monolayer and collagen gels. *J Formos Med Assoc* 2001;100:377-82.
26. HAN YP, TUAN TL, HUGES M, GARNER WL. Transforming growth factor-beta and tumor necrosis factor-alpha-mediated induction and proteolytic activation of MMP-9 human skin. *J Biol Chem* 2001;276:22341-50.
27. SOBRIN L, LIU Z, MONROY DC, SOLOMON A, SELZER MG, LOKESHHWAR BL, PLUGFELDER. Regulation of MMP-9 activity in human tear fluid end corneal epithelial culture supernatant. *Inv Ophthalmol Vis Science* 2000;41:1703-09.
28. GÓMEZ DE, ALONSO DF, YOSHIJI H, THORGEIRSSON UP. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol* 1997;74:111-22.
29. SUGITA Y, MORITA E, TANAKA T, NAKAMURA K, YAMAMOTO S. Production of tissue inhibitor of metalloproteinase -1 and -2 by cultured keratinocytes. *J Dermatol Sci* 2000;22:107-16.
30. TOMINAGA M, MIGITA K, NAKAMURA H, ICHINOSE Y, FURUYA T, ORIGUCHI T, KAWABE Y, HIDA A, NAKAMURA T, EGUCHI K. Expression of metalloproteinase-2 (gelatinase A) in labial salivary glands of patients with Sjögren syndrome with HTLV-1 infection. *Clin Exp Rheumatol* 1999;17:463-6.
31. PERIDES G, TANNER-BROWN LM, ESKILDSEN MA, KLEMPNER MS. *Borrelia burgdoferi* induces matrix metalloproteinases by neural cultures. *J Neurosci Res* 1999;58:779-90.

32. MORY N, SATO H, HAYASHIBARA T, SENBA M, GELAZIUNAS C, WADA A, HIROYAMA T, YAMAMOTO N. *Helicobacter pylori* induces matrix metalloproteinase-9 through activation of nuclear factor kappa B. *Gastroenterology* 2003;124:983-92.
33. WILKIN J, DAHL M, DETMAR M, DRAKE L, FEINSTEIN A, ODOM R, POWELL F. Standard classification of rosacea: report of the National Rosacea Society expert committee on the classification and staging of rosacea. *J Am Acad Dermatol* 2002;46:584-7.
34. FITZATRICK TB, ORTONNE J-P. Normal skin color and general considerations of pigmentary disorders. In: FREEDBERG IM, EISEN AZ, WOLFF K, AUSTEN KF, GOLSMITH LA, KATZ SI, editors. Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine. 6<sup>th</sup> edition. New York: McGraw-Hill 2003; p.819-836.
35. LEVER WF, SCHAUMBURG-LEVER G. Doenças inflamatórias dos apêndices epidérmicos e da cartilagem. In: LEVER WF, SCHAUMBURG-LEVER G, editors. Histopatologia da Pele. 7<sup>a</sup> ed. São Paulo: Manole, 1991. p. 198-209.
36. MARKS R, HARCOURT-WEBSTER JN. Histopathology of rosacea. *Arch Dermatol* 1969;100:683-91.
37. BODEY B, BODEY B, SIEGAL SE, KAISER HE. Matrix metalloproteinase expression in malignant melanomas: tumor-extracellular matrix interactions in invasion and metastasis. *In Vivo* 2001;15:57-64.
38. SENTURK, N, YILDIZ L, SULLU Y, KANDEMIR B, TURANLI AY. Expression of bcl-2 protein in active skin lesions of Behçet. *Int J Dermatol* 2001;40:747-50.
39. JANSEN T, PLEWIG G. Rosacea: classification and treatment. *J R Soc Med* 1997;90:140-50.
40. WILSON DC, SMITH ML, KING Jr LE. Arthropod bites and stings. In: : FREEDBERG IM, EISEN AZ, WOLFF K, AUSTEN KF, GOLDSMITH LA, KATZ SI, editors. Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine. 6<sup>th</sup> edition. New York: McGraw-Hill 2003; p.2289-98.

41. SIBENGE S, GAWKRODGER DJ. Rosacea: a study of clinical patterns, blood flow, and the role of *Demodex folliculorum*. *J Am Acad Dermatol* 1992;26:590-3.
42. WIKLKIN JK. Rosacea. Pathophysiology and treatment. *Arch Dermatol* 1994;130:359-62.
43. EL SHAZLY AM, GHANEUM BM, MORSY TA, AATY HEA. The pathogenesis of *Demodex folliculorum* (hair follicular mites) in female with and without rosacea. *J Egypt Soc Parasitol* 2001;31:867-75.
44. SAMPAIO EP. Metaloproteinases e citocinas: correlação com as formas clínicas de hanseníase. Congresso Brasileiro de Patologia, 24<sup>o</sup>, 2003, Florianópolis. Anais do Congresso, 2003.
45. AFONSO AA, SOBRIN L, MONROY DC, SELZER M, LOKESSHAWAR B, PFLUGFELDER SC. Tear fluid gelatinase B activity correlates with IL-1 alpha concentration and fluorescein clearance in ocular rosacea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40: 2506-12.
46. ZUBER TJ. Rosacea. *Dermatology* 2000; 27: 309-318.
47. REBORA A. Rosacea. *J Invest Dermatol* 1987 88; Suppl 1:56-60.
48. THIBOUTOT DM. Acne Rosacea. *Am Fam Physician* 1994;50:1691-7.
49. PLEWIG G, JANSEN T. Rosacea. In: FREEDBERG IM, EISEN AZ, WOLFF K, AUSTEN KF, GOLSMITH LA, KATZ SI, editors. Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine. 6<sup>th</sup> edition. New York: McGraw-Hill 2003; p. 688-96.
50. LI L, AKERS K, EISEN A, SELTZER JL. Activation of gelatinase A (72-kDa collagenase) induced by monensin in normal human fibroblasts. *Exp Cell Res* 1997;232: 322-30.
51. BERANGER JY, GODEAU G, FRANCES C, ROBERT L, HORNEBECK W. Presence of gelatinase A and metalloelastase type protease at the plasma membrane of human skin fibroblasts. Influence of cytokines and growth factors on cell-associated metalloendopeptidase levels. *Cell Biol Int* 1994;18:715-22.

52. LÊ J, DAUCHOT P, PERROT JL, CAMBAZARD F, FREY J, CHAMSON A. Quantitative zymography of matrix metalloproteinases by measuring hydroxiperoline: application to gelatinases A and B. *Electrophoresis* 1999;20:2824-29.
53. LAMOREAUX WJ, FITZGERALD MEC, REINER A, HASTY KA, CHARLES ST. Vascular endothelial growth factor increase release of gelatinase A and decreases release of tissue inhibitor of metalloproteinases by microvascular endothelial cells *in vitro*. *Microvascular Res* 1998;55:29-42.
54. MAILLARD JL, FAVREAU C, REBOUD RM. Role of monocyte/macrophage derived matrix-metalloproteinases (gelatinases) in prolonged skin inflammation. *Clin Chim Acta* 1995;233:61-74.
55. KANBE N, TANAKA A, KANBE M, ITAKURA A, KUROSAWA M, MATSUDA H. Human mast cells produce matrix metalloproteinase 9. *Eur J Immunol* 1999;29:2645-9.
56. 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: 1167-77.
57. COLLIER IE, BRUNS GA, GOLDBERG GI, GERHARD DS. On the structure and chromosome location of the 72- and 92-kDa human type IV collagenase genes. *Genomics* 1991;9: 429-34.
58. RAZA SL, CORNELIUS LA. Matrix metalloproteinases: pro- and anti-angiogenic activities. *J Investig Dermatol Symp Proc* 2000;5:47-54.
59. WONG WR, KOSSODO S, KOICHEVAR IE. Influence of cytokines on matrix metalloproteinases produced by fibroblasts cultured in monolayer and collagen gels. *J Formos Med Assoc* 2001;100:377-82.

**Table 1** – General characteristics of patients with inflammatory rosacea.

Patients n= 34*		n	%
Sex	Male	14	41,2
	Female	20	58,8
Phototypes	II	13	38,2
	III	18	52,9
	IV	1	2,9
	V	2	5,9
Rosacea stages	II	20	58,8
	III	8	23,5
	Fima + II	1	2,9
	Granulomatous	5	14,7
Df	Presence	12	35,3
	Absence	22	64,7

\* Mean age of patients = 43,2 years; Df: *Demodex folliculorum*



**Table 2** – Expression of MMP-9 in the fibroblasts of patients with inflammatory rosacea and the presence of *Demodex folliculorum*.

MMP-9 (+)	<i>Df</i>	No <i>Df</i>	Total
0	0	2	2
1	0	6	6
2	5	9	14
3	7	5	12
Total	12	22	34

$p < 0.05$ ;  $r_s = +0.42$

MMP-9: matrix metalloproteinase-9; (+): score of positivity; *Df*: *Demodex folliculorum*

#### 5.4. Versão em português do artigo 2

*“Demodex folliculorum and metalloproteinases-2 and -9 expression in inflammatory rosacea”*

**Demodex folliculorum e a expressão das metaloproteinases-2 e -9 na rosácea inflamatória**

#### **Autores**

Renan Rangel Bonamigo, Lucio Bakos, Maria Isabel Albano Edelweiss, André Cartell.

Serviço de Dermatologia e Serviço de Patologia - Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil.

#### **Correspondência**

Renan Rangel Bonamigo – Rua Dr. Vale 605/401B, CEP 90560-010, Porto Alegre, RS, Brasil. Telefone:+55.51.33467209; Fax:+55.51.33467209; correio eletrônico: [rbona@portoweb.com.br](mailto:rbona@portoweb.com.br)

## Resumo

**Fundamentos:** o *Demodex folliculorum* (*Df*) pode participar como um co-fator patogênico na rosácea. As metaloproteinases-2 e -9 da matriz (MMP-2 e MMP-9) possuem entre suas ação regulatórias, a desnaturação do colágeno e a participação em processos inflamatórios. Em determinadas doenças dermatológicas e de outras origens, inclusive infecciosas, estas metaloproteinases estão sendo implicadas como partícipes da patogênese. Na rosácea ocular, a MMP-9 já foi avaliada como importante para o desenvolvimento do quadro clínico. O presente estudo avaliou a associação e a correlação entre a presença do *Df* e a expressão da MMP-2 e da MMP-9, em casos de rosácea. Foi verificada a distribuição do *Df* em relação aos estágios e formas especiais de rosácea.

**Métodos:** foi realizado um estudo transversal, envolvendo 34 pacientes portadores de rosácea com componente inflamatório (25 casos incidentes e 9 prevalentes). Foram avaliados a idade, o sexo, o fototipo cutâneo, o estágio ou as formas clínicas especiais, a presença do *Demodex folliculorum* à histopatologia cutânea e a expressão imunoistoquímica da MMP-2 e da MMP-9, pelos métodos semi-quantitativo e qualitativo. Através do qui-quadrado ( $p < 0,05$ ) e da correlação de Spearman ( $r_s > +0,3$ ), foram avaliadas as associações e a correlação esperadas.

**Resultados:** a média da idade foi de 43.2 anos, 20 pacientes (58,8%) eram mulheres e 14 (41,2%), homens. Os fototipos II e III foram 91,1% da amostra. Os estágios II e III foram 82,4% da amostra. O *Df* esteve presente em 12 casos (35,3%) da amostra analisada. Não se detectou distribuição diferenciada do *Df* entre os estágios e as formas especiais da rosácea inflamatória. A expressão da MMP-2 não foi significativamente diferente entre pacientes com rosácea com ou sem *Demodex*

*folliculorum*. Não foi encontrada correlação linear entre a presença do *Df* e o grau de positividade e de intensidade para a expressão da MMP-2. A expressão da MMP-9 foi estatisticamente maior nos fibroblastos nos casos de rosácea com a presença de *Df* quando comparados aos casos de rosácea sem *Df* ( $p= 0,035$ ). Foi encontrada correlação linear entre a presença do *Df* e o grau de positividade para a expressão da MMP-9 nos fibroblastos de pacientes com rosácea inflamatória ( $r_s > +0,3$ )

**Conclusões:** diante de suas ações patogênicas reconhecidas e da associação e correlação verificadas no presente estudo, se conclui que a MMP-9 pode se constituir em um mediador patogênico em determinados casos de rosácea inflamatória, particularmente naqueles em que haja a presença do *Demodex folliculorum*.

**Palavras-chave:** metaloproteinases; gelatinases; *Demodex folliculorum*; rosácea.

## Introdução

Um amplo conjunto de fatores provocativos e agravantes estão relacionados ao desenvolvimento da rosácea, como a radiação ultravioleta, distúrbios psicológicos, uso de medicamentos vasodilatadores e outras substâncias ingeridas vasodilatadoras, temperaturas elevadas de alimentos, processos infecciosos (*Helicobacter pylori*) e doenças que liberam mediadores causadores de vasodilatação e/ou inflamação.<sup>1-14</sup>

O *Demodex folliculorum* (*Df*) é um ácaro comensal encontrado em pacientes com rosácea, no interior do infundíbulo folicular e nos ductos sebáceos. Raramente, também pode ser encontrado em área extra-folicular, em meio à formação de abscessos dérmicos e associado à formação de granulomas epitelióides não-caseosos, do tipo corpo estranho, com a presença de muitas células gigantes multinucleadas.<sup>14-17</sup>

Porém, como o *Df* nem sempre está presente na rosácea, mesmo em quadros com intenso processo inflamatório e, eventualmente, pode ser encontrado em outras doenças dermatológicas e na pele de indivíduos sem dermatose, o seu verdadeiro papel patogênico ainda é controverso.<sup>15,18,19</sup>

As metaloproteinases da matriz (MMPs) são enzimas elaboradas por células residentes do epiderma e do derma, sendo ativadas por vários fatores internos e externos ao organismo.<sup>20-27</sup> Em situação de secreção excessiva das MMPs e estas não sendo bloqueadas adequadamente por seus inibidores teciduais específicos (TIMPs), pode ocorrer ativação de células inflamatórias, angiogênese e desestruturação da arquitetura dérmica por colagenólise.<sup>25,28,29</sup>

Na literatura recente, há descrição de estudos que encontraram associação entre doenças infecciosas e a presença provavelmente patogênica da metaloproteinase-2 (MMP-2) e da metaloproteinase-9 (MMP-9).<sup>30-32</sup>

Desta forma, foram avaliados, neste estudo, pacientes com rosácea em estágios II e III da classificação de Plewig e Kligman,<sup>15</sup> além de variantes com características inflamatórias, quanto à presença do *Df* e a associação desse possível fator provocativo ou agravante com a expressão da MMP-2 e da MMP-9 em determinadas células e estruturas cutâneas dos portadores de rosácea.

### **Material e Métodos**

O estudo foi realizado nos Serviços de Dermatologia e de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil).

Antes do início da pesquisa, o Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre aprovou o estudo e um termo de consentimento foi obtido dos pacientes participantes.

Nesse estudo transversal foram avaliados, clinicamente e histopatologicamente 34 casos de rosácea. O critério de inclusão foi ser portador de rosácea na face em estágios II e III ou de alguma forma especial com processo inflamatório sobreposto, seguindo a classificação de Plewig e Kligman<sup>15</sup>. De acordo com a recente classificação da *National Rosacea Society* (dos Estados Unidos da América do Norte),<sup>33</sup> seriam pacientes com o subtipo II de rosácea ou com a variante granulomatosa ou com o edema central facial persistente (componente do subtipo I).

Foram avaliadas como variáveis a idade, o sexo, o fototipo cutâneo segundo a classificação de Fitzpatrick,<sup>34</sup> a classificação clínica da rosácea segundo Plewig e

Kligman,<sup>15</sup> a evidência histopatológica da presença do *Demodex folliculorum* e a expressão imunistoquímica da MMP-2 e da MMP-9.

Foram excluídos os pacientes menores de 18 anos; as gestantes; os pacientes com rosácea que apresentassem apenas alterações vasculares; os pacientes com as formas especiais de rosácea esteróide e gram-negativa, seguindo a classificação de Plewig e Kligman; os pacientes que estavam em uso ou haviam usado, nos últimos 30 dias, corticoesteróides, retinóides, imunossuppressores, antibióticos, antiinflamatórios não-esteróides e medicamentos com ação antineutrofílica, via sistêmica e, nos últimos 7 dias, os mesmos medicamentos, via tópica.

Após a realização da biópsia da lesão facial com *punch* de 3mm, o material foi fixado em formalina tamponada a 10% por 12 horas. Após procedimentos de rotina e inclusão em parafina, os espécimes foram seccionados em cortes de 5 micrômetros e avaliados através da histopatologia convencional pelo método de hematoxilina e eosina (H-E).

O diagnóstico histopatológico de rosácea e as evidências da presença do *Df* foram estabelecidos pelo conjunto de achados em análise da lâmina, de acordo com as características estabelecidas pela literatura.<sup>15,16,35,36</sup>

Com novos cortes de 5 micrômetros, a imunistoquímica foi realizada de acordo com normatizações validadas em experimentos científicos publicados.<sup>37,38</sup>

Foram preparadas lâminas com solução de organossilano, realizada a rehidratação e o bloqueio da peroxidase endógena. A recuperação antigênica foi realizada com o uso do tampão citrato e, após, foram aplicados os anticorpos primários para MMP-2 (Neomarkers Incorporation, Fremont, USA) e MMP-9 (Chemicon International Incorporation, Temecula, USA) e o anticorpo secundário associado ao sistema de amplificação biotina-estreptavidina (DAKO Corporation, Carpinteria, USA), por 30 minutos. Ao final, foi adicionado a solução cromógena

diaminobenzidina (DAKO Corporation, Carpinteria, USA) e procedeu-se a 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).

As lâminas de imunistoquímica foram interpretadas por 4 avaliadores diferentes, que não conheciam a história clínica do paciente. A média das avaliações foi utilizada como resultado final.

Foram utilizados os métodos semi-quantitativo (0, quando nenhuma coloração estava presente; 1+, quando até 25% da estrutura ou tipo celular estavam coradas; 2+, quando estavam coradas entre 25-75%; 3+, quando mais que 75% estavam coradas) e qualitativo (coloração intensa, moderada ou fraca), adaptados de métodos descritos na literatura corrente.<sup>37,38</sup> A intensidade da coloração, para fins de análise estatística, foi codificada pela escala 0= sem coloração, fraca= 1+, moderada= 2+ e intensa= 3+.

A expressão das MMPs foi avaliada nos queratinócitos, nos histiócitos (monócitos e macrófagos), nos fibroblastos, na unidade pilar, nas células endoteliais e na matriz extracelular.

Os dados foram avaliados estatisticamente pelo teste do qui-quadrado, sendo o  $p < 0,05$  considerado como significativo. A correlação linear entre variáveis foi avaliada pela correlação de Spearman ( $r_s$ ). Os dados foram analisados através do *software* SPSS, versão 11.

## **Resultados**

Entre os 34 pacientes do estudo, a idade variou entre 19 e 73 anos, com uma média de 43,2 anos, sendo 20 pacientes do sexo feminino (58,8%) e 14 do sexo masculino (41,2%).



Quantos aos fototipos cutâneos, 13 pacientes possuíam fototipo II (38,2%), 18 fototipo III (52,9%), 1 fototipo IV (2,9%) e 2 fototipo V (5,9%).

Dos 34 casos, 20 pacientes estavam no estágio II (58,8%), 8 pacientes estavam em estágio III (23,5%), 1 paciente era portador de fima associado ao estágio II (2,9%) e 5 pacientes eram portadores de rosácea granulomatosa (14,7%). No subtipo 2 (rosácea papulo-pustular) haveria a soma do estágio II e III, perfazendo 28 pacientes da amostragem (82,4%).

A histopatologia por H-E demonstrou evidências da presença do *Demodex folliculorum* em 12 de 34 biópsias (35,3%). Em estudo caso-controle simultâneo a este foi evidenciada a presença histopatológica do *Df* em 2 de 29 pacientes controles, sem rosácea (6,9%).

A tabela 1 apresenta os dados dos pacientes com rosácea inflamatória, quanto às variáveis acima.

Analisando a distribuição do *Df* entre os estágios e formas especiais da rosácea encontrados no estudo, não foram detectadas associações significativas.

Utilizando a análise estatística, não foi detectada uma associação significativa entre a MMP-2 e a presença do *Df* ( $p > 0,05$ ) nos pacientes com rosácea, para todos os tipos celulares e estruturas avaliadas. Igualmente, não foi detectada uma correlação entre a presença do *Df* e a expressão da MMP-2, quanto ao escore de positividade e intensidade da coloração.

Quanto à expressão da MMP-9, nos fibroblastos, se verificou associação estatisticamente significativa com a rosácea que possui na sua histopatologia evidências da presença do *Df* ( $p = 0,035$ ) (tabela 2). Os demais tipos celulares e estruturas avaliadas não apresentaram associação com significância estatística. Igualmente, existiu correlação linear entre a presença do *Df* e o índice de positividade para MMP-9, nos fibroblastos dos pacientes com rosácea inflamatória ( $r_s = +0,42$ , com  $p < 0,05$ ).

Ao serem agrupados os quatro diferentes níveis de intensidade de coloração à imunohistoquímica em dois níveis - ausência de coloração com coloração fraca (0 e 1+) e moderada coloração com a intensa (2+ e 3+) - se verificou que nos queratinócitos haveria uma correlação linear entre a expressão da MMP-9 e os níveis de intensidade ( $r_s = +0,33$ ). Os demais tipos celulares e estruturas avaliadas não chegariam a atingir a correlação ( $r_s > +0,3$ ), porém alguns estariam próximos a ela (histiócitos,  $r_s = +0,29$ ; unidade pilar,  $r_s = +0,29$ ; matriz extracelular,  $r_s = +0,29$ )

## Discussão

O *Demodex folliculorum* é encontrado, geralmente, em pequeno número no infundíbulo folicular e nos ductos sebáceos, podendo ocorrer em todos os estágios da rosácea. Histopatologicamente, sua participação parece ser a de um comensal, mas muito provavelmente torna-se patogênico em determinados casos, quando é decisivo para o desenvolvimento da demodicidose, dermatose independente da rosácea e que é incluída no diagnóstico diferencial da mesma.<sup>16,35,39,40</sup>

Em relação à rosácea, o *Df* já foi definido como um fator agravante, sendo que o uso de alguns tipos de substâncias tópicas (cremes com cosméticos e com corticoesteróides, por exemplo) ou a presença de circunstâncias clínico-farmacológicas imunodepressoras podem favorecer a multiplicação desse ácaro, tornando-o um agente secundário relevante em determinados quadros de rosácea, em função do extenso processo inflamatório que pode induzir.<sup>14,41</sup>

Rufli & Büchner demonstraram histopatologicamente, através de anticorpos monoclonais para células T, que a maioria das células inflamatórias que compõe os infiltrados granulomatosos relacionados à presença do *Df* na rosácea são linfócitos T auxiliares. Tal achado poderia embasar a hipótese sobre a importância da resposta imunológica mediada por células na patogênese da rosácea.<sup>16</sup>

Alguns autores acreditam que as alterações vasculares e do tecido conjuntivo dérmico favorecem a proliferação do *Df*, o qual pode conferir sustentabilidade ao processo patogênico da rosácea.<sup>17,42</sup>

Georgala *et al.* encontraram o *Df* em 90,2% de pacientes com rosácea e em 11,9% dos controles.<sup>17</sup> A diferença encontrada foi estatisticamente significativa ( $p < 0,01$ ). A maioria dos linfócitos encontrados nos infiltrados eram marcados com anticorpos monoclonais para CD4 (aproximadamente entre 90-95% das células dos infiltrados) e elevadas presenças de células de Langerhans e de macrófagos foram verificadas entre os casos de rosácea. Os autores defendem a existência de uma reação de hipersensibilidade tardia (tipo IV) aos antígenos do *Df* na patogênese da rosácea.<sup>17</sup>

El-Shazly *et al.* encontraram 44% de presença do *Df* em pacientes com rosácea e 23% em controles, sendo essa diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ). Incluindo apenas os pacientes com a rosácea papulo-pustulosa, a presença do ácaro foi de 83,3%.<sup>43</sup>

As metaloproteinases -2 e -9, também denominadas de gelatinase A e gelatinase B, respectivamente, já foram identificadas associadamente às infecções pelo vírus linfotrópico das células T humana (HTLV), pelo *Helicobacter pylori*, pela *Borrelia burgdoferi* e pelo *Mycobacterium leprae*.<sup>30-32,44</sup> Até o momento, ao que nos parece revisando a literatura, não há relatos de associação entre o *Demodex folliculorum* e as MMPs. Outrossim, há trabalhos demonstrando um aumento da expressão e da atividade da MMP-9 na rosácea ocular.<sup>27,45</sup>

O presente estudo possui uma amostra de pacientes com rosácea com uma diferença menor entre os sexos feminino e masculino (58,8% e 41,2%, respectivamente), quando comparadas à literatura.<sup>2,46-48</sup> Esse detalhe talvez tenha ocorrido pela seleção dos casos (exclusão da rosácea eritemato-telangiectásica,

considerada em estágio I). É reconhecido que os quadros clínicos de gravidade maior possuem uma freqüência elevada nos homens.<sup>15,46</sup>

A freqüência dos fototipos cutâneos encontrados é semelhante aos descritos na literatura vigente, com o predomínio de tipos II e III (juntos correspondem a 91,1% dos pacientes com rosácea), sendo interessante o dado da ausência do fototipo I.<sup>17,49</sup>

Quanto à distribuição do *Demodex folliculorum* entre os estágios II, III, fima associado ao estágio II e rosácea granulomatosa, não foram detectadas associações específicas, confirmando dados da literatura que demonstram a possibilidade do *Df* estar distribuído entre todos os estágios da rosácea, ainda que com uma maior tendência a estar presente em casos com maior processo inflamatório.<sup>16,41</sup>

A ausência de associação e de correlação linear entre a expressão imunohistoquímica da MMP-2 e a presença de *Df* pode se dever às características dessa metaloproteinase, a qual é secretada amplamente mesmo em contextos fisiológicos, para o constante remodelamento estrutural do derma.<sup>21,22,50,51</sup> Portanto, é difícil diferenciar o significado de sua presença, já que mesmo tecidos cutâneos considerados normais podem expressar quantidades visualizadas pela imunohistoquímica.<sup>20,21,50,51</sup> Talvez a utilização de métodos que quantifiquem o grau de atividade das MMPs, como a zimografia, possam conferir à MMP-2 níveis de comparabilidade nos estudos onde a sua expressão é difusamente distribuída.<sup>52,53</sup>

A expressão elevada de forma significativa ( $p < 0,01$ ) da MMP-9 nos fibroblastos dos pacientes com rosácea e *Df* presente e a correlação linear também existente ( $r_s > +0,3$ ) entre a presença do *Df* e o grau de positividade à expressão da MMP-9 podem contribuir para a compreensão de uma parcela da etiopatogenia da rosácea, pois essa é uma metaloproteinase reconhecidamente com potencial patogênico grande e pode ser secretada pelos fibroblastos, entre outras células.<sup>22,54-</sup>

<sup>59</sup> A questão é se um fator prévio estimularia a elaboração e ação da MMP-9, que aumentaria a quimiotaxia para as células inflamatórias ao redor do ácaro ou se a própria presença do *Df* seria o fator estimulador para a elaboração da MMP-9, já que as citocinas e os fatores de crescimento liberados pelo processo inflamatório adjacente ao *Df* poderiam agir sobre as células produtoras de MMP-9.<sup>26,45</sup>

O agrupamento em dois níveis de intensidade da coloração pela imunohistoquímica demonstrou a existência de uma correlação linear entre a presença do *Df* e a intensidade da expressão da MMP-9 no queratinócitos ( $r_s > +0,3$ ). Detectaram-se correlações limítrofes para alcançar a relevância ( $r_s = +0,29$ ) (o que talvez ocorresse com uma amostra maior) para os histiócitos, a unidade pilar e a matriz extracelular. Esses dados corroboram a idéia que essas outras fontes elaboradoras de MMP-9 (queratinócitos, unidade pilar e histiócitos) possam contribuir para o processo patogênico da rosácea inflamatória.

Portanto as MMPs, em particular a MMP-9, podem ser mais um elo explicativo da relação entre a presença do *Demodex folliculorum* e a expressão clínica de certos casos de rosácea.

### **Agradecimentos**

Agradecemos à bióloga Ivana Hófke de Souza Gallota e à Dra. Andréa Rodrigues C. Pires pelo auxílio na execução e interpretação inicial da imunohistoquímica. Agradecemos ao professor Dr. Mário Wagner pelo apoio bioestatístico. Agradecemos ao Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE – Hospital de Clínicas de Porto Alegre) e à Fundação Médica do Rio Grande do Sul pelo auxílio financeiro viabilizador desse estudo.

## Referências

1. SOBYE P. Aetiology and pathogenesis of rosacea. *Acta Dermatol Venereol* 1950;30:137-58.
2. BERG M, LIDÉN S. An epidemiological study of rosacea. *Acta Dermatol Venereol* 1989;69:419-23.
3. JANSEN T, PLEWIG G. Rosacea: classification and treatment. *J R Soc Med* 1997;90:140-50.
4. WILKIN JK. Vasodilator rosacea. *Arch Dermatol* 1980;116:598.
5. WILKIN JK. Rosacea. *Int J Dermatol* 1983;22:393-400.
6. WILKIN JK. Flushing reactions: consequences and mechanisms. *Ann Intern Med* 1981;95:468-76.
7. WILKIN JK. Heat, not caffeine, induces flushing in erythematotelangiectatic rosacea [abstract]. *J Invest Dermatol* 1979;73:310.
8. REICHERT S, TRUCHETET F, CUNY JF, GRANDIDIER M. Tumeur carcinoïde a révélation cutanée. *Ann Dermatol Venerol* 1994;121:485-8.
9. CREAMER JD, WHITTAKER, SJ, GRIFFITHS WAD. Multiple endocrine neoplasia type 1 presenting as rosacea. *Clin Exp Dermatol* 1996;21:170-1.
10. REBORA A, DRAGO F, PICCIOTTO A. *Helicobacter pylori* in patients with rosacea. *Am J Gastroenterol* 1994;89:1603-4.
11. BONAMIGO RR, LEITE CS, WAGNER M, BAKOS L. Rosacea and *Helicobacter pylori*: interference of systemic antibiotic in the study of possible association. *J Eur Acad Dermatol* 2000;14:424-425.
12. NEUMANN E, FRITZ A. Capillaropathy and capillaroneogenesis in the pathogenesis of rosacea. *Int J Dermatol* 1998;37:263-6.

13. COHEN CG, KRAHN L, WISE TN, EPSTEIN S, ROSS R. Desilusions of disfigurement in a woman with acne rosacea. *Gen Hosp Psychiatry* 1991; 13:273-7.
14. BURNS DA. Follicle mites and their role in disease. *Clin Exp Dermatol* 1992;17:152-5.
15. PLEWIG G, KLIGMAN AM. Rosacea. In: PLEWIG G, KLIGMAN AM, editors. *Acne e rosacea*. 3<sup>rd</sup> ed. Berlin: Springer-Verlag; 2000. p. 456-501.
16. RUFLI T, BÜCHNER SA. T-cell subsets in acne rosacea lesions and the possible role of *Demodex folliculorum*. *Dermatologica* 1984;169:1-5.
17. GEORGALA S, KATOULIS AC, KYLAFIS GD, KOUMANTAKI-MATHIOUDAKI E, ARONI K. *Demodex folliculorum* in papulopustular rosacea. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2001;15:441-44.
18. ERBAGCI Z, OZGOZTASI O. The significance of *Demodex folliculorum* density in rosacea. *Int J Dermatol* 1998;134:679.
19. PURCELL SM, HAYES TJ, Dixon SL. Pustular folliculitis associated with *Demodex folliculorum*. *J Am Acad Dermatol* 1986; 15:1159.
20. SELTZER JL, ADAMS AS, GRANT GA, EISEN AZ. Purification and properties of a gelatin-specific neutral protease from human skin. *J Sci Biol Chem* 1981;256: 4662-8.
21. COLLIER IE, WILHELM SM, EISEN AZ, MARMER BL, GRANT GA, SELTZER JL, KRONBERGER A, HE CS, BAUER EA, GOLDBERG GT. H-ras oncogen-transformed human bronchial epithelial cells (TBE-1) secrete a single metalloproteinase capable of degrading basement membrane collagen. *J Biol Chem* 1988;263:6579-87.
22. COLLIER IE, BRUNS GA, GOLDBERG GI, GERHARD DS. On the structure and chromosome location of the 72- and 92-kDa human type IV collagenase genes. *Genomics* 1991;9: 429-34.

23. AMANO S, AKUTSU N, NISHIMA T, CHAMPLIAUD MF, BURGESSON RE, ADACHI E. Importance of balance between matrix synthesis and degradation in basement membrane formation. *Exp Cell Res* 2001;271:249-62.
24. KESKI-OJA, LOHI J, TUUTTILA A, TRYGGUASON K, VARTIO T. Proteolytic processing of the 72.000-Da type IV collagenase by urokinase plasminogen activator. *Exp Cell Res* 1992;202:471-6.
25. WONG WR, KOSSODO S, KOICHEVAR IE. Influence of cytokines on matrix metalloproteinases produced by fibroblasts cultured in monolayer and collagen gels. *J Formos Med Assoc* 2001;100:377-82.
26. HAN YP, TUAN TL, HUGES M, GARNER WL. Transforming growth factor-beta and tumor necrosis factor-alpha-mediated induction and proteolytic activation of MMP-9 human skin. *J Biol Chem* 2001;276:22341-50.
27. SOBRIN L, LIU Z, MONROY DC, SOLOMON A, SELZER MG, LOKESHHHWAR BL, PLUGFELDER. Regulation of MMP-9 activity in human tear fluid end corneal epithelial culture supernatant. *Inv Ophtholmo Vis Science* 2000;41:1703-09.
28. GÓMEZ DE, ALONSO DF, YOSHIJI H, THORGEIRSSON UP. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol* 1997;74:111-22.
29. SUGITA Y, MORITA E, TANAKA T, NAKAMURA K, YAMAMOTO S. Production of tissue inhibitor of metalloproteinase -1 and -2 by cultured keratinocytes. *J Dermatol Sci* 2000;22:107-16.
30. TOMINAGA M, MIGITA K, NAKAMURA H, ICHINOSE Y, FURUYA T, ORIGUCHI T, KAWABE Y, HIDA A, NAKAMURA T, EGUCHI K. Expression of metalloproteinase-2 (gelatinase A) in labial salivary glands of patients with Sjögren syndrome with HTLV-1 infection. *Clin Exp Rheumatol* 1999;17:463-6.



31. PERIDES G, TANNER-BROWN LM, ESKILDSEN MA, KLEMPNER MS. *Borrelia burgdoferi* induces matrix metalloproteinases by neural cultures. *J Neurosci Res* 1999;58:779-90.
32. MORY N, SATO H, HAYASHIBARA T, SENBA M, GELAZIUNAS C, WADA A, HIROYAMA T, YAMAMOTO N. *Helicobacter pylori* induces matrix metalloproteinase-9 through activation of nuclear factor kappa B. *Gastroenterology* 2003;124:983-92.
33. WILKIN J, DAHL M, DETMAR M, DRAKE L, FEINSTEIN A, ODOM R, POWELL F. Standard classification of rosacea: report of the National Rosacea Society expert committee on the classification and staging of rosacea. *J Am Acad Dermatol* 2002;46:584-7.
34. FITZATRICK TB, ORTONNE J-P. Normal skin color and general considerations of pigmentary disorders. In: FREEDBERG IM, EISEN AZ, WOLFF K, AUSTEN KF, GOLDSMITH LA, KATZ SI, editors. Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine. 6<sup>th</sup> edition. New York: McGraw-Hill 2003; p.819-836.
35. LEVER WF, SCHAUMBURG-LEVER G. Doenças inflamatórias dos apêndices epidérmicos e da cartilagem. In: LEVER WF, SCHAUMBURG-LEVER G, editors. Histopatologia da Pele. 7<sup>a</sup> ed. São Paulo: Manole, 1991. p. 198-209.
36. MARKS R, HARCOURT-WEBSTER JN. Histopathology of rosacea. *Arch Dermatol* 1969;100:683-91.
37. BODEY B, BODEY B, SIEGAL SE, KAISER HE. Matrix metalloproteinase expression in malignant melanomas: tumor-extracellular matrix interactions in invasion and metastasis. *In Vivo* 2001;15:57-64.
38. SENTURK, N, YILDIZ L, SULLU Y, KANDEMIR B, TURANLI AY. Expression of bcl-2 protein in active skin lesions of Behçet. *Int J Dermatol* 2001;40:747-50.
39. JANSEN T, PLEWIG G. Rosacea: classification and treatment. *J R Soc Med* 1997;90:140-50.

40. WILSON DC, SMITH ML, KING Jr LE. Arthropod bites and stings. In: : FREEDBERG IM, EISEN AZ, WOLFF K, AUSTEN KF, GOLDSMITH LA, KATZ SI, editors. Fitzpartick's Dermatology in General Medicine. 6<sup>th</sup> edition. New York: McGraw-Hill 2003; p.2289-98.
41. SIBENGE S, GAWKRODGER DJ. Rosacea: a study of clinical patterns, blood flow, and the role of *Demodex folliculorum*. *J Am Acad Dermatol* 1992;26:590-3.
42. WIKLKIN JK. Rosacea. Pathophysiology and treatment. *Arch Dermatol* 1994;130: 359-62.
43. EL SHAZLY AM, GHANEUM BM, MORSY TA, AATY HEA. The pathogenesis of *Demodex folliculorum* (hair follicular mites) in female with and without rosacea. *J Egypt Soc Parasitol* 2001;31:867-75.
44. SAMPAIO EP. Metaloproteinases e citocinas: correlação com as formas clínicas de hanseníase. Congresso Brasileiro de Patologia, 24<sup>o</sup>, 2003, Florianópolis. Anais do Congresso, 2003,.
45. AFONSO AA, SOBRIN L, MONROY DC, SELZER M, LOKESSHAWAR B, PFLUGFELDER SC. Tear fluid gelatinase B activity correlates with IL-1 alpha concentration and fluorescein clearance in ocular rosacea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40: 2506-12.
46. ZUBER TJ. Rosacea. *Dermatology* 2000; 27: 309-318.
47. REBORA A. Rosacea. *J Invest Dermatol* 1987 88; Suppl 1:56-60.
48. THIBOUTOT DM. Acne Rosacea. *Am Fam Physician* 1994;50:1691-7.
49. PLEWIG G, JANSEN T. Rosacea. In: FREEDBERG IM, EISEN AZ, WOLFF K, AUSTEN KF, GOLDSMITH LA, KATZ SI, editors. Fitzpartick's Dermatology in General Medicine. 6<sup>th</sup> edition. New York: McGraw-Hill 2003; p. 688-96.
50. LI L, AKERS K, EISEN A, SELTZER JL. Activation of gelatinase A (72-kDa collagenase) induced by monensin in normal human fibroblasts. *Exp Cell Res* 1997;232: 322-30.

51. BERANGER JY, GODEAU G, FRANCES C, ROBERT L, HORNEBECK W. Presence of gelatinase A and metalloelastase type protease at the plasma membrane of human skin fibroblasts. Influence of cytokines and growth factors on cell-associated metalloendopeptidase levels. *Cell Biol Int* 1994;18:715-22.
52. LÊ J, DAUCHOT P, PERROT JL, CAMBAZARD F, FREY J, CHAMSON A. Quantitative zymography of matrix metalloproteinases by measuring hydroxiperoline: application to gelatinases A and B. *Electrophoresis* 1999;20:2824-29.
53. LAMOREAUX WJ, FITZGERALD MEC, REINER A, HASTY KA, CHARLES ST. Vascular endothelial growth factor increase release of gelatinase A and decreases release of tissue inhibitor of metalloproteinases by microvascular endothelial cells *in vitro*. *Microvascular Res* 1998;55:29-42.
54. MAILLARD JL, FAVREAU C, REBOUD RM. Role of monocyte/macrophage derived matrix-metalloproteinases (gelatinases) in prolonged skin inflammation. *Clin Chim Acta* 1995;233:61-74.
55. KANBE N, TANAKA A, KANBE M, ITAKURA A, KUROSAWA M, MATSUDA H. Human mast cells produce matrix metalloproteinase 9. *Eur J Immunol* 1999;29:2645-9.
56. 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: 1167-77.
57. COLLIER IE, BRUNS GA, GOLDBERG GI, GERHARD DS. On the structure and chromosome location of the 72- and 92-kDa human type IV collagenase genes. *Genomics* 1991;9: 429-34.
58. RAZA SL, CORNELIUS LA. Matrix metalloproteinases: pro- and anti-angiogenic activities. *J Invest Dermatol Symp Proc* 2000;5:47-54.

59. WONG WR, KOSSODO S, KOCHEVAR IE. Influence of cytokines on matrix metalloproteinases produced by fibroblasts cultured in monolayer and collagen gels.

*J Formos Med Assoc* 2001;100:377-82.

**Tabela 1** – Características gerais dos pacientes com rosácea inflamatória.

Pacientes n= 34*		n	%
Sexo	Masculino	14	41,2
	Feminino	20	58,8
Fototipos	II	13	38,2
	III	18	52,9
	IV	1	2,9
	V	2	5,9
Estágios da Rosácea	II	20	58,8
	III	8	23,5
	Fima + II	1	2,9
	Granulomatosa	5	14,7
Df	Presença	12	35,3
	Ausência	22	64,7

\* Idade Média dos pacientes = 43,2 anos; Df: *Demodex folliculorum*

**Tabela 2** – Expressão da MMP-9 nos fibroblastos na rosácea inflamatória e a presença do *Demodex folliculorum*.

MMP-9 (+)	<i>Df</i> presente	<i>Df</i> ausente	Total
0	0	2	2
1	0	6	6
2	5	9	14
3	7	5	12
Total	12	22	34

$p < 0,05$ ;  $r_s = +0,42$

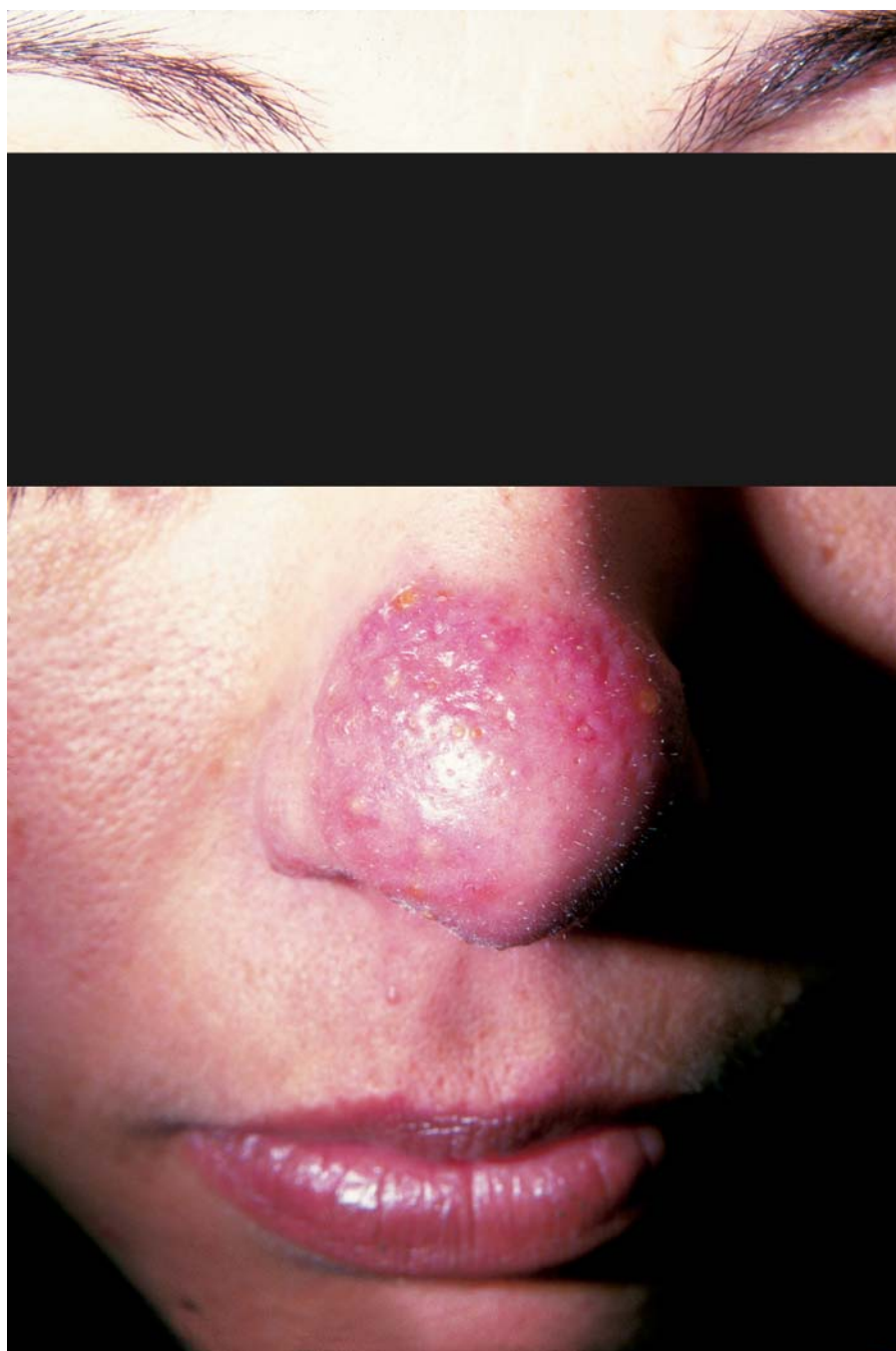
MMP-9: metaloproteinase-9 da matriz; (+): escore de positividade; *Df*: *Demodex folliculorum*

## ANEXOS

### ANEXO A - Fotografias clínicas de rosácea inflamatória

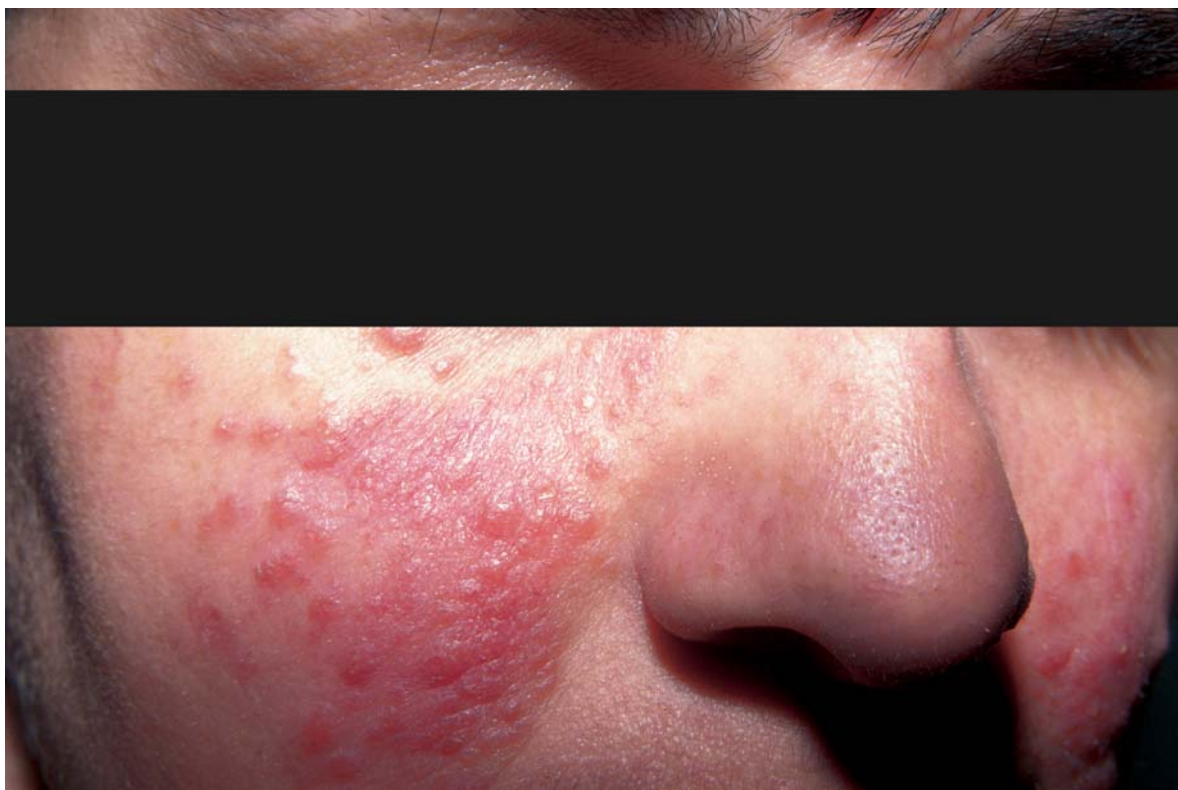


**Figura A1** – Estágio II (Plewig e Kligman) ou Subtipo 2 (*National Rosacea Society*).



**Figura A2** – Estágio II com variante fima (Plewig e Kligman) ou Subtipos 2 e 3 associados (*National Rosacea Society*).





**Figura A3** – Variante granulomatosa (Plewig e Kligman, *National Rosacea Society*).

## **ANEXO B - Questionário Padrão**

**B.1** Instrumento de Avaliação Investigativa do Projeto de Pesquisa “A Expressão Imunoistoquímica das Metaloproteinases 2 e 9 na Rosácea Inflamatória”. PPG Clínica Médica – UFRGS – Doutorado

Autor principal : Dr. Renan Rangel Bonamigo

### **CASOS**

**Data:**

**n:**

**Identificação:**

**Origem e registro:**

**Idade:**

**Sexo:**

**Fototipo Cutâneo:**

**Rosácea:**

(II) (III) (granulomatosa) (conglobata) (fulminans) (edema persistente)

**Histopatológico (lesão da face):**

Laboratório original:do bloco:

Principal achado na revisão ao H-E:

**Imunoistoquímica:**

Metaloproteinase 2 (gelatinase A):

Metaloproteinase 9 (gelatinase B):

**Observações adicionais relevantes:**

**B.2** Instrumento de Avaliação Investigativa do Projeto de Pesquisa “A Expressão Imunoistoquímica das Metaloproteinases 2 e 9 na Rosácea Inflamatória”. PPG Clínica Médica – UFRGS – Doutorado

Pesquisador principal : Dr. Renan Rangel Bonamigo

### **CONTROLES**

**Data:**

**n:**

**Identificação:**

**Origem e registro:**

**Idade:**

**Sexo:**

**Doença Inflamatória:**

**Histopatológico (lesão da face):**

Laboratório original:do bloco:

Principal achado na revisão ao H-E:

**Imunohistoquímica:**

Metaloproteinase 2 (gelatinase A):

Metaloproteinase 9 (gelatinase B):

**Observações adicionais relevantes:**



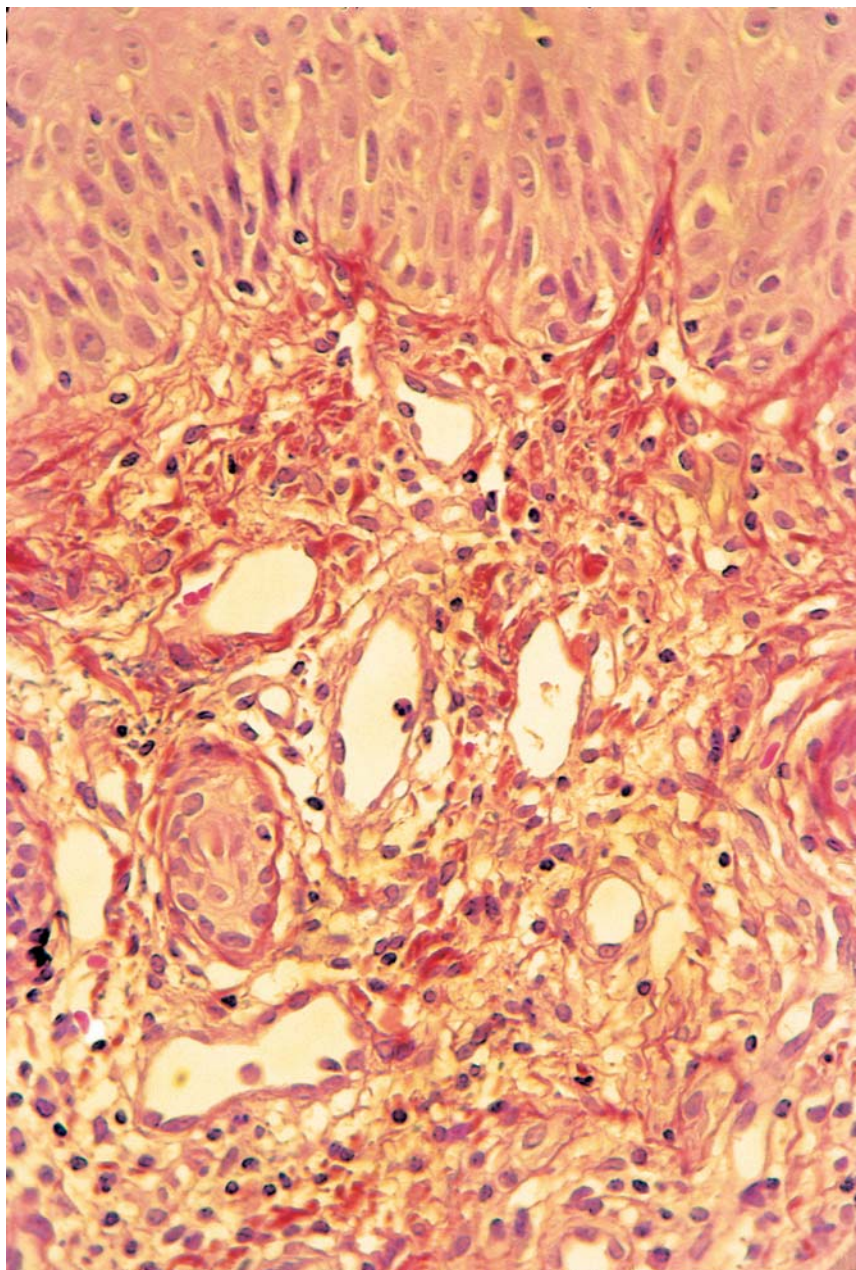
**ANEXO D - Protocolo específico de cada paciente integrante do estudo -  
análise da imunoistoquímica pelos avaliadores**

n=

MMP-2	epiderma	histiócitos	fibroblastos	matriz	unid. pilar	endotélio

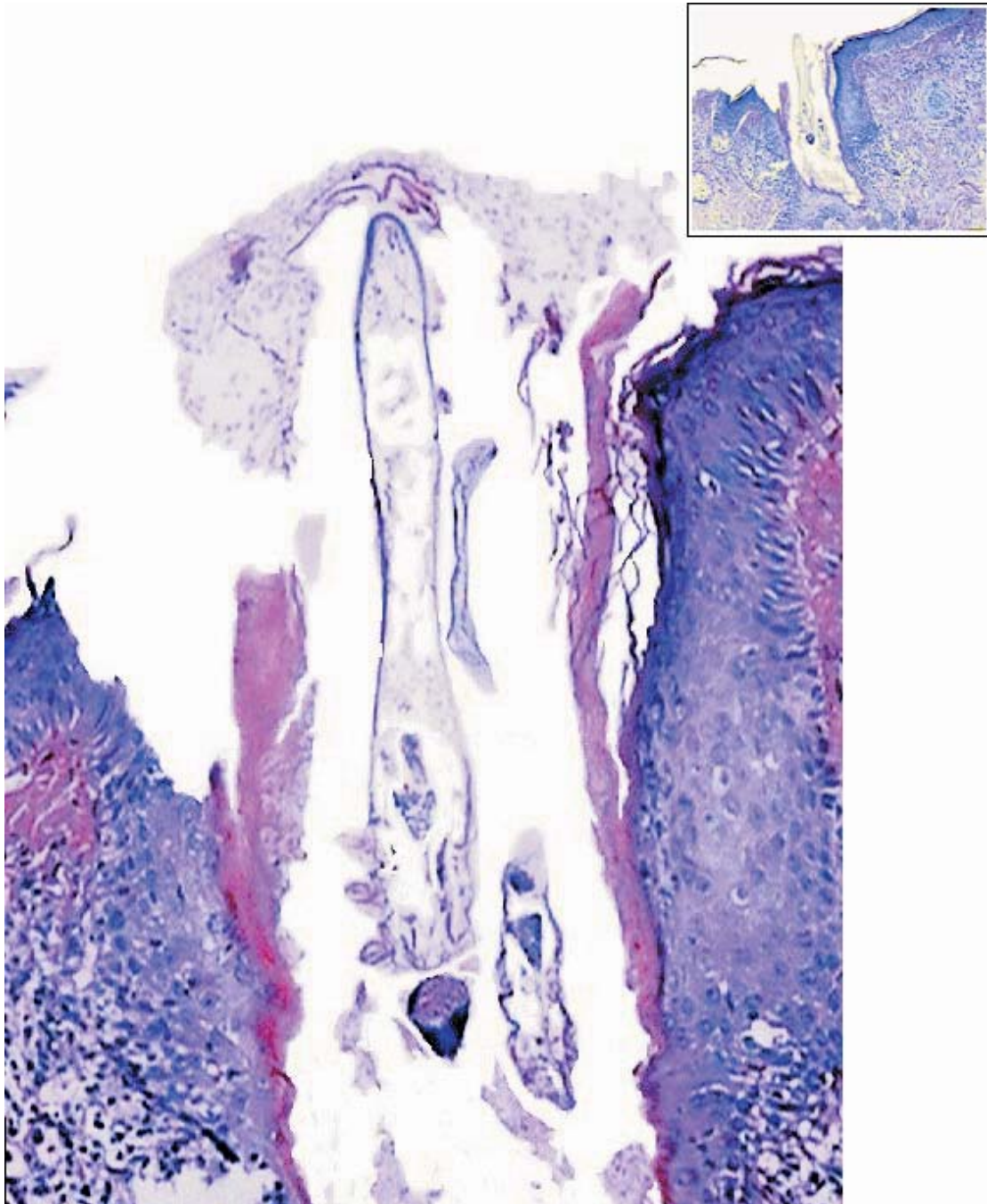
MMP-9	epiderma	histiócitos	fibroblastos	matriz	unid. pilar	endotélio

**ANEXO E – Fotografias da histopatologia da rosácea (H – E)**

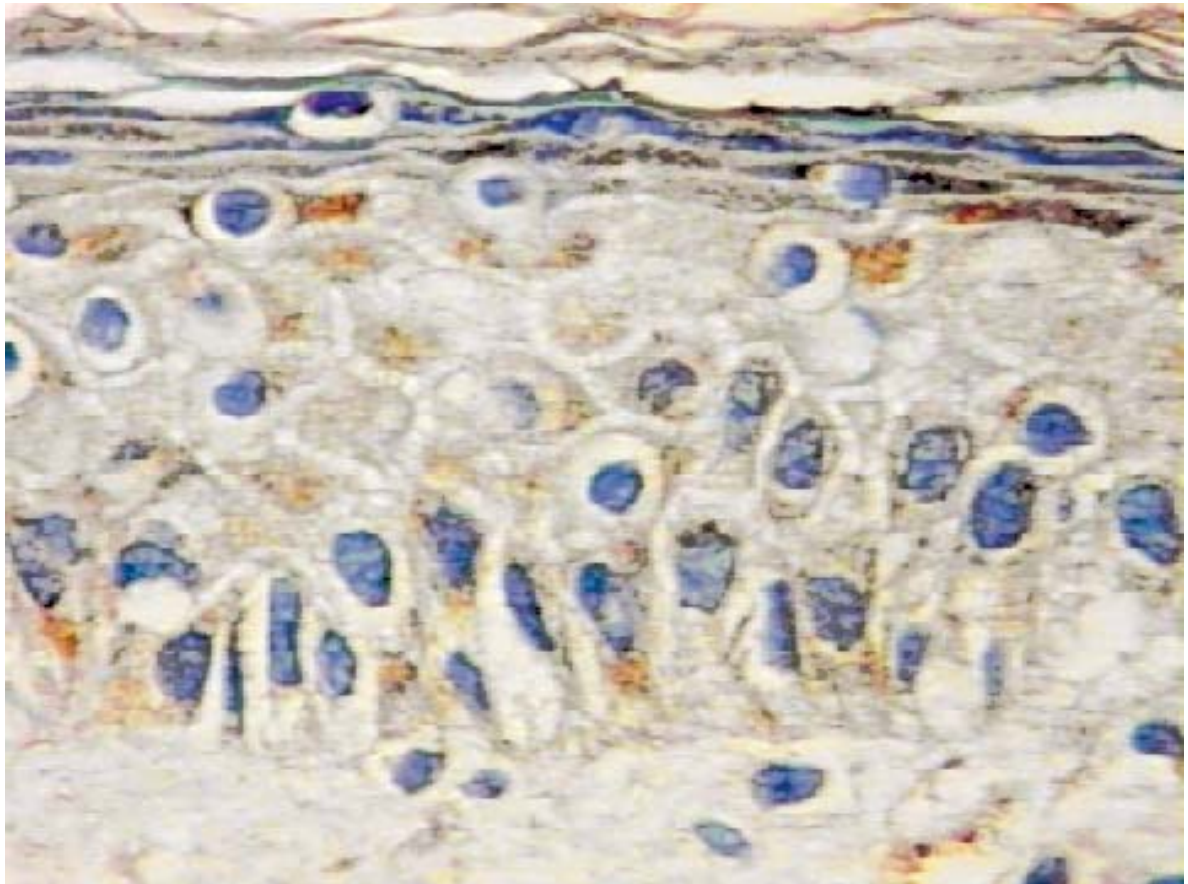


**Figura E1** – Neovascularização, dilatação vascular e processo inflamatório dérmico (H-E, x 250, no original)



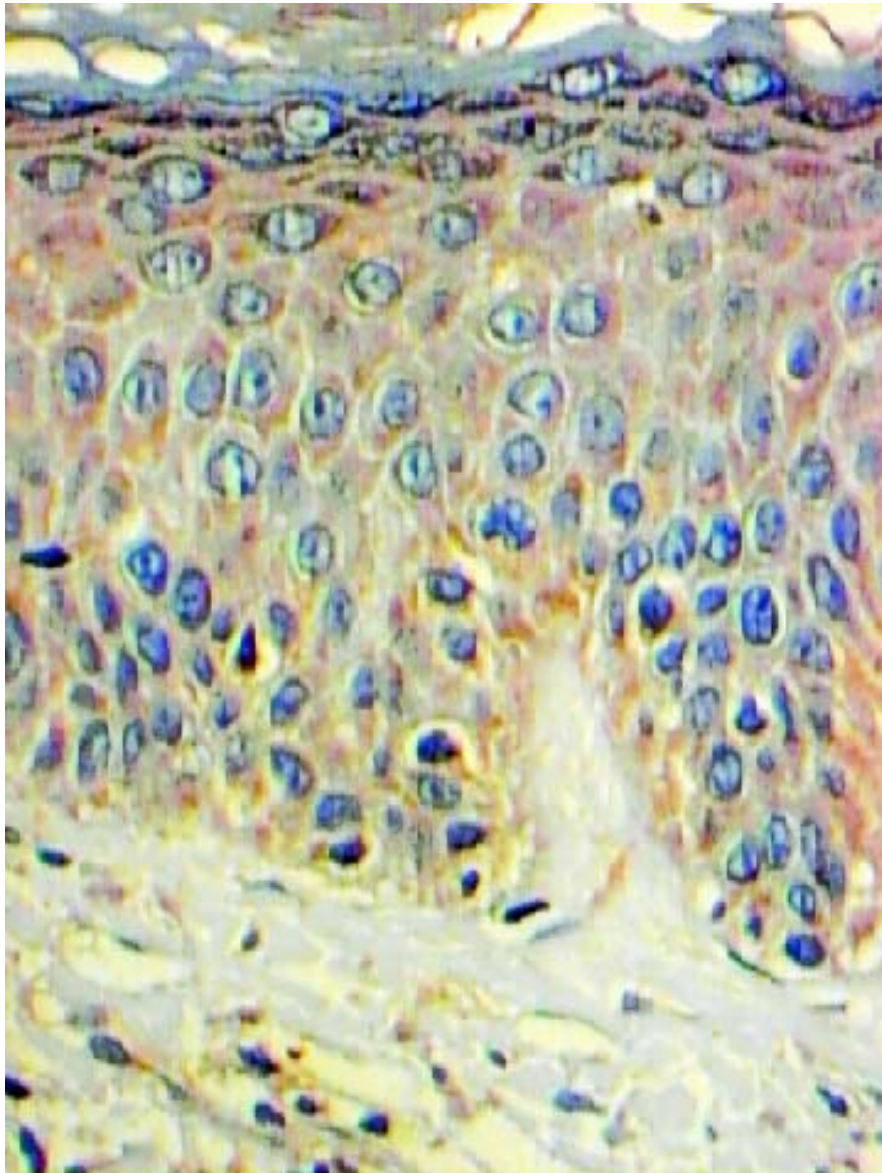


**Figura E2** – *Demodex folliculorum* e processo inflamatório adjacente (H-E, x 250. Detalhe, H-E, x 40. Nos originais)

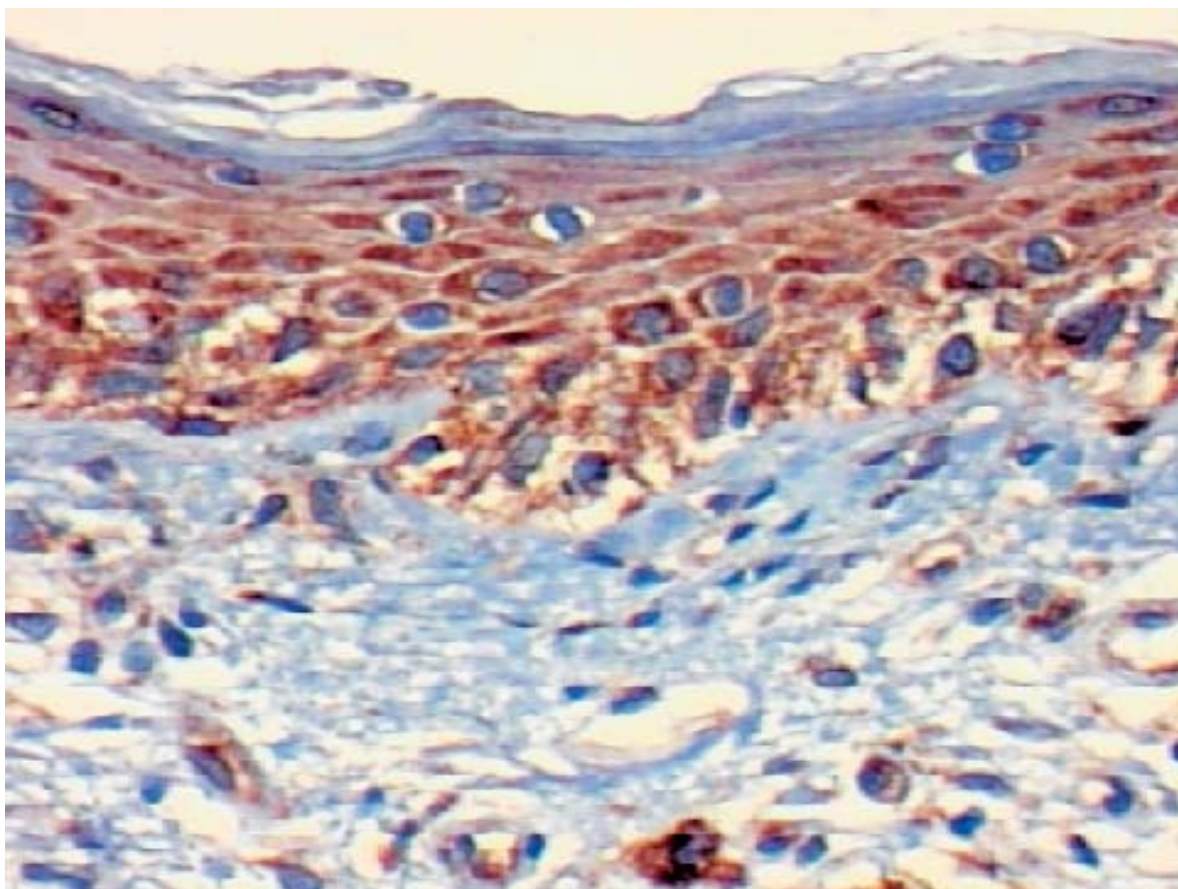
**ANEXO F - Fotografias da Imunoistoquímica da rosácea e controles**

**Figura F1** – Expressão da MMP-9 em paciente controle: **1+** e **fraca** em queratinócitos (imunoperoxidase-DAB, x 400, no original)





**Figura F2** – Expressão da MMP-2 em paciente controle: **2+** e **moderada** em queratinócitos (imunoperoxidase-DAB, x 250, no original)

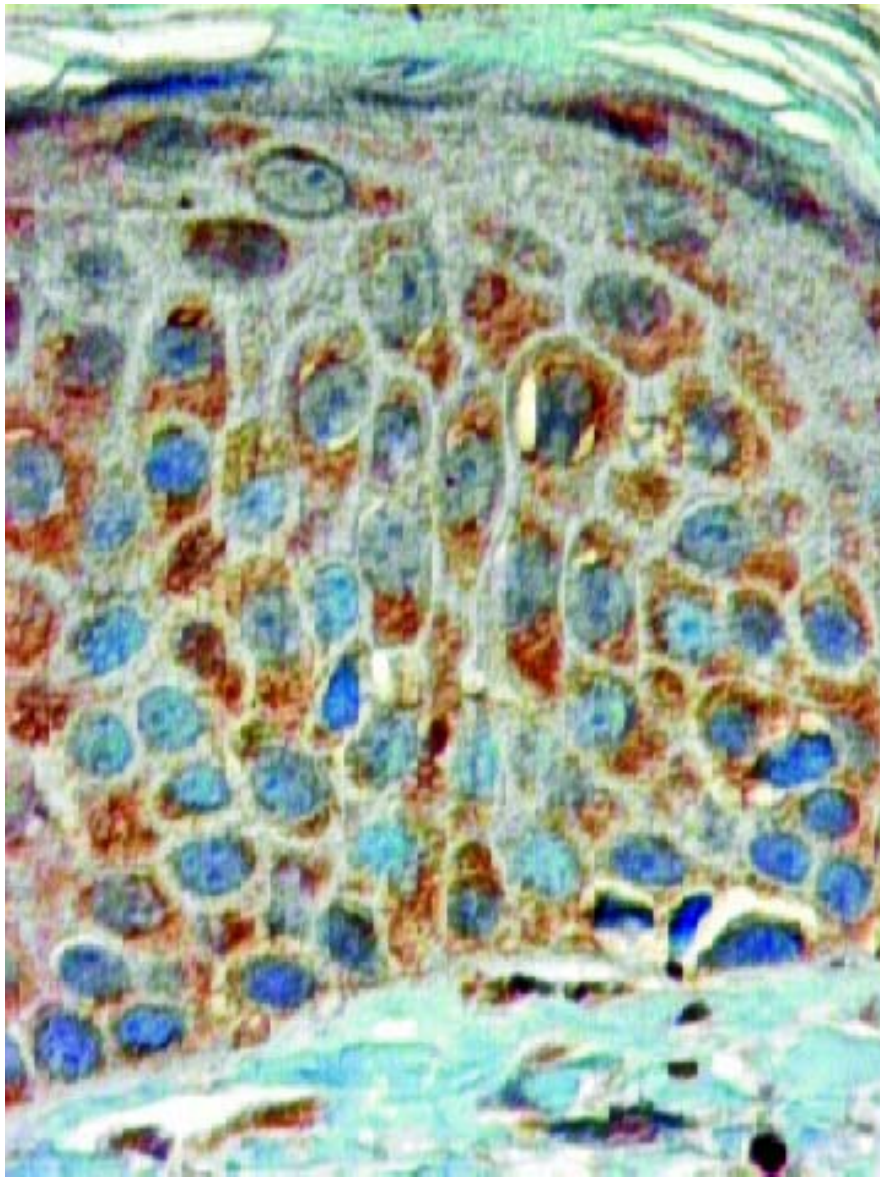


**Figura F3** – Expressão da MMP-9 em paciente com rosácea: **3+** e **intensa** em queratinócitos (imunoperoxidase-DAB, x 250, no original)

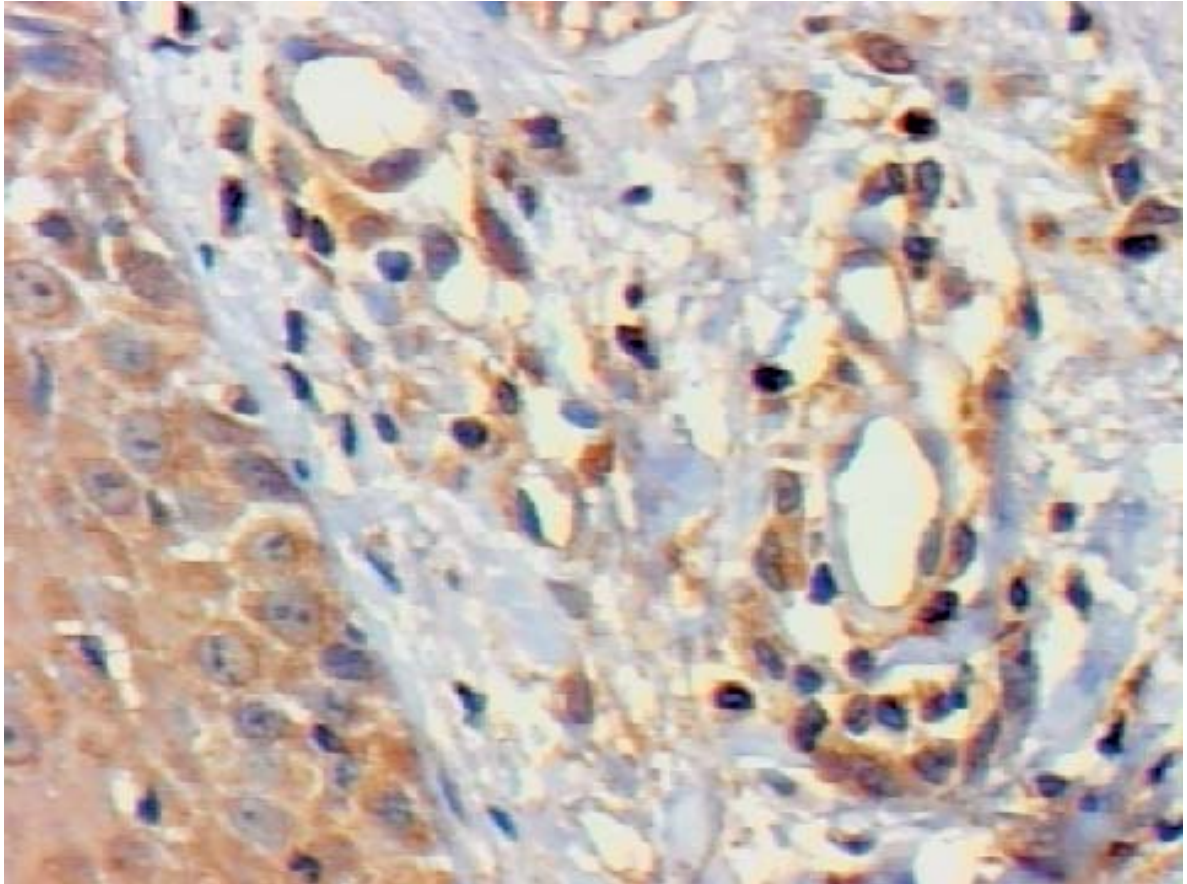


**Figura F4** – Expressão da MMP-2 em paciente controle: **3+** e **moderada** em queratinócitos e unidade pilar (imunoperoxidase-DAB, x 40, no original)

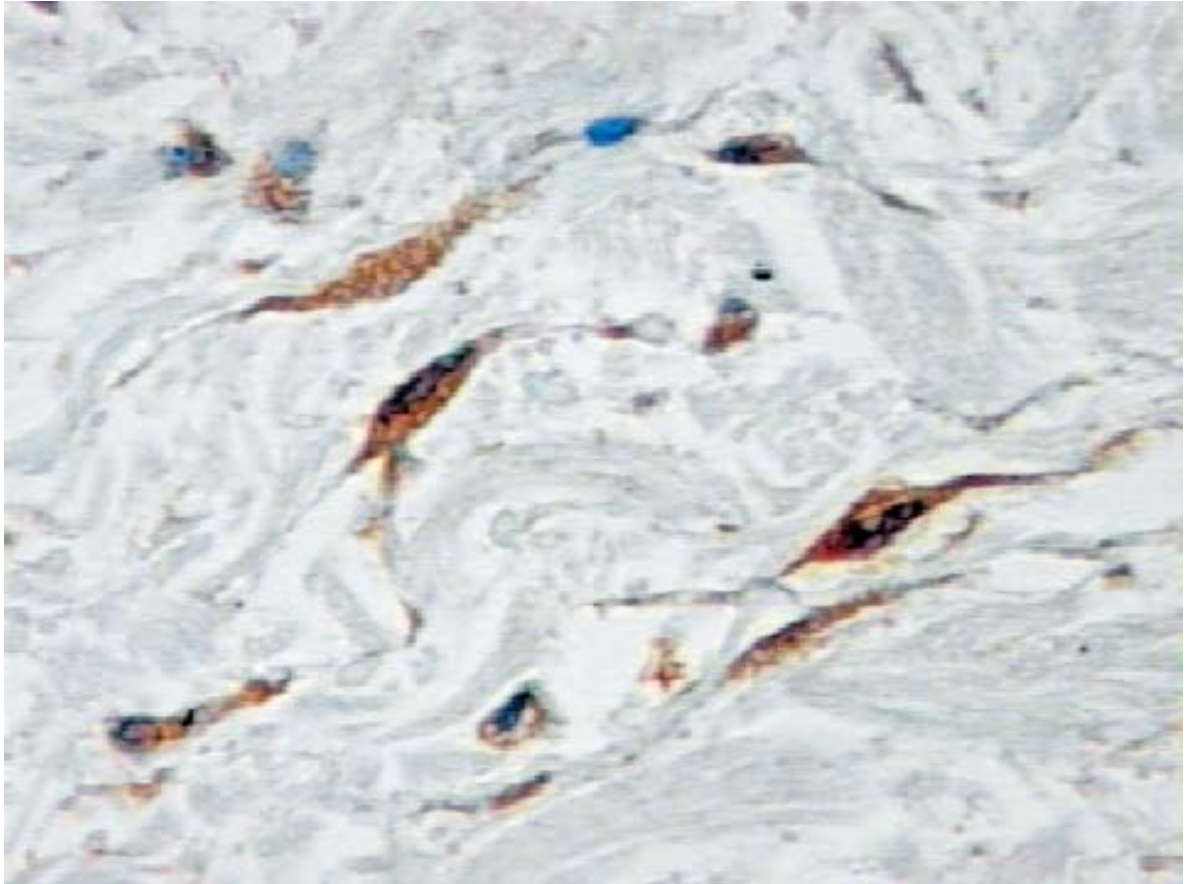




**Figura F5** – Expressão da MMP-9 em paciente com rosácea: **2+** e **moderada** em queratinócitos (imunoperoxidase-DAB, x 400, no original)

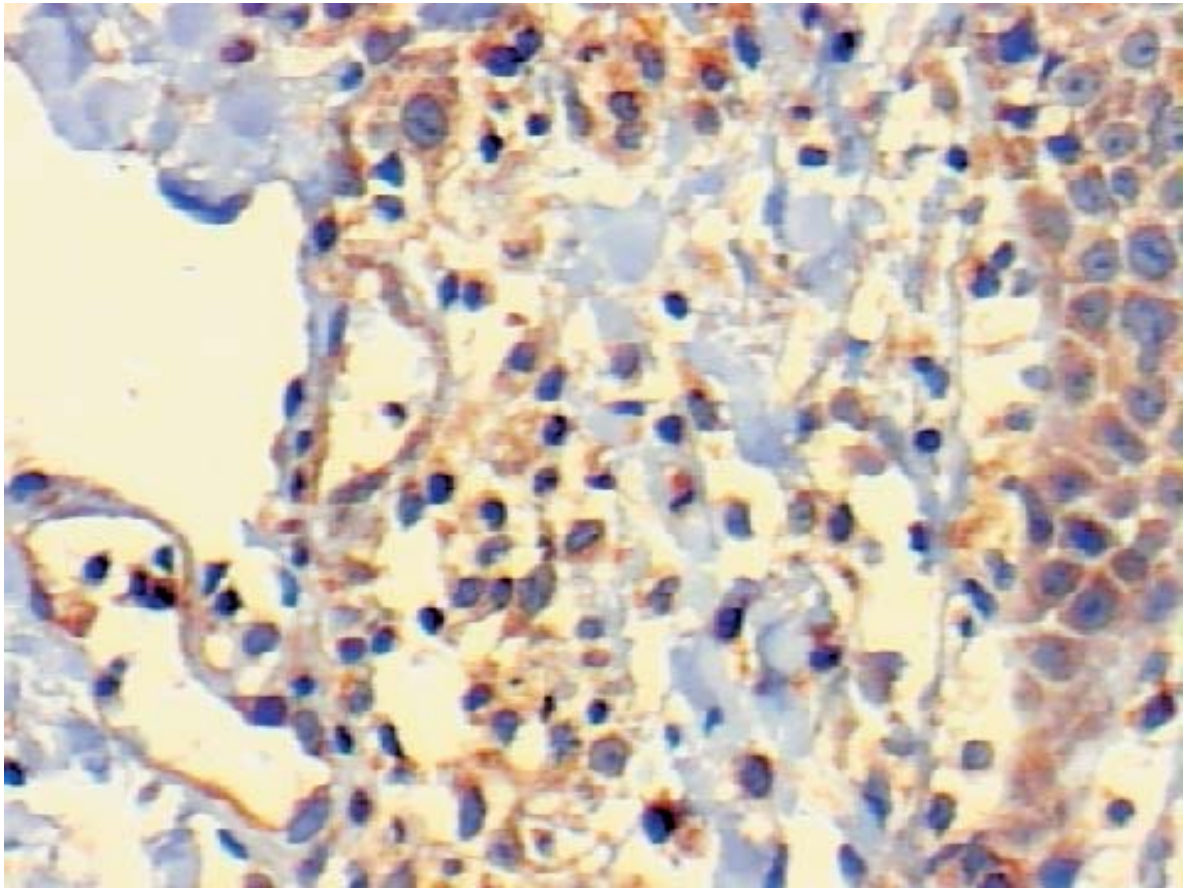


**Figura F6** – Expressão da MMP-9 em paciente com rosácea: **1+** e **fraca** em endotélio; **1+** e **fraca** em matriz (imunoperoxidase-DAB, x 250, no original)



**Figura F7** – Expressão da MMP-2 em paciente controle: **3+** e **intenso** em fibroblastos (imunoperoxidase-DAB, x 400, no original)





**Figura F8** – Expressão da MMP-9 em paciente com rosácea: **2+** e **moderada** em histiócitos e área adjacente (imunoperoxidase-DAB, x 250, no original)

## **ANEXO G - Termo de Consentimento Pós-Informação**

### Introdução

Este documento visa informar o participante a respeito do projeto de pesquisa intitulado “A expressão imunoistoquímica das metaloproteinases -2 e -9 na rosácea inflamatória”.

Após as explicações verbais e as que seguem, se o paciente manifestar interesse em participar desta pesquisa deverá assinar o seu consentimento.

### Identificações

Autor principal: Dr. Renan Rangel Bonamigo.

Orientador: Dr. Lucio Bakos

Co-orientadora: Dra. Maria Isabel Edelweiss

Patologista Participante (de acordo com o Laboratório de origem):

Local: Serviços de Dermatologia e de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre/Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

### Características da pesquisa

Esta pesquisa tentará compreender como acontecem as principais alterações na pele das pessoas com rosácea. Para isso é importante identificar algumas substâncias na pele dessas pessoas e comparar com pessoas que não possuem a rosácea e possuem outro tipo de doença de pele (com inflamação).

Para os pacientes que participarem do estudo, haverá necessidade do exame clínico e a coleta de material da pele (biópsia da pele) onde haja a lesão. Para isso se utiliza uma pinça especial com no máximo 03 milímetros de diâmetro e, se necessário, se realiza um ponto para fechar o pequeno orifício aberto.

É utilizada uma medicação anestésica antes da coleta, através de uma pequena injeção na pele. Em termos de complicações, é incomum que ocorram, sendo relatados o desconforto da injeção e do ponto (que deverá ser retirado entre 5-7 dias após a coleta) e, às vezes, uma pequena cicatriz que, na maioria dos casos, não é significativa (quando possível se escolhe um local pouco visível na pele, para a coleta do material).

Se a pessoa for sabidamente alérgica à substância da anestesia não se realiza esta coleta.

Este material irá para a análise no Serviço de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e no laboratório Anticorpos do Rio de Janeiro (RJ), nos quais, através

de colorações especiais e da análise em microscópio, será realizada a tentativa de identificar certas substâncias na pele.

### Informações adicionais



O paciente pode desistir do consentimento a qualquer momento, sem prejuízos no seu atendimento.

As informações pessoais e o resultado dos exames são confidenciais, no sentido de resguardar a identidade dos participantes.

Os participantes não serão onerados financeiramente para a realização das etapas da pesquisa.

Os pesquisadores suspenderão o estudo caso se suspeite de danos ou riscos à saúde do integrante do estudo.

O paciente será atendido pelo Hospital de Clínicas de Porto Alegre, se o paciente sofrer qualquer dano comprovadamente associado à pesquisa em questão.

Permanentemente os autores estarão à disposição nos horários e locais a combinar para esclarecimento da pesquisa.

Serão fornecidos 3 números de telefone para o integrante do estudo obter esclarecimentos com maior presteza sobre dúvidas durante o estudo: (051)3168000 ramal Zona 13, 3212600 e 99682782.

Este documento é aprovado pela Comissão de Ética do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e está baseado na Normas de Pesquisa em Saúde do Conselho Nacional de Saúde (1988).

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Pesquisador      Nome do Pesquisador

Consentimento:

Eu, \_\_\_\_\_  
(Assinatura e Nome Completo do Participante do Estudo)

entendi as explicações verbais e escritas e consinto em participar da pesquisa nos termos em questão.

Porto Alegre,