



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

THAMY YAMASHITA SHIBAYAMA

**POSITIVIDADE DO IMUNOMARCADOR FOXP3 EM
CÉLULAS T REGULADORAS EM LESÕES DE MICOSE
FUNGOIDE EM FASES CLÍNICAS INICIAIS E EM
DERMATOSES INFLAMATÓRIAS COMO FATOR
AUXILIAR PARA O DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para
obtenção do título de Doutor em Patologia.

Orientador - Prof. Dr. Silvio Alencar Marques
Coorientadora - Profa. Dra. Mariangela E A Marques

Botucatu

2015

THAMY YAMASHITA SHIBAYAMA

**POSITIVIDADE DO IMUNOMARCADOR FOXP3 EM CÉLULAS
T REGULADORAS EM LESÕES DE MICOSE FUNGOIDE EM
FASES CLÍNICAS INICIAIS E EM DERMATOSES
INFLAMATÓRIAS COMO FATOR AUXILIAR PARA O
DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para
obtenção do título de Doutor em Patologia.

Orientador - Prof. Dr. Silvio Alencar Marques
Coorientadora - Profa. Dra. Mariangela E A Marques

Botucatu-SP
2015

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO – CÂMPUS DE BOTUCATU – UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO – CRB 8/7500

Shibayama, Thamy Yamashita.

Positividade do imunomarcador FOXP3 em células T reguladoras em lesões de micose fungoide em fases clínicas iniciais e em dermatoses inflamatórias como fator auxiliar para o diagnóstico / Thamy Yamashita Shibayama. – Botucatu, 2015

Tese (doutorado) – universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Silvio Alencar Marques

Coorientador: Mariangela Esther Alencar Marques

Capes: 40105008

1.Micoses fungoides. 2.Linfoma. 3.Células T. 4.Imunoistoquímica. 5.Marcadores genéticos.

Palavras-chave: linfoma cutâneo; FOXP3; Imunoistoquímica; Linfócitos T; Micose Fungoide.

THAMY YAMASHITA SHIBAYAMA

**POSITIVIDADE DO IMUNOMARCADOR FOXP3 EM CÉLULAS
T REGULADORAS EM LESÕES DE MICOSE FUNGOIDE EM
FASES CLÍNICAS INICIAIS E EM DERMATOSES
INFLAMATÓRIAS COMO FATOR AUXILIAR PARA O
DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para
obtenção do título de Doutor em Patologia.

Orientador - Prof. Dr. Silvio Alencar Marques
Coorientadora - Profa. Dra. Mariangela E A Marques

Aprovado em ____/____/____

Banca Examinadora

Professor(a)

Professor(a)

Professor(a)

DEDICATÓRIA

A Deus, guia da minha vida.

Aos meus amados pais Silvio e Lucia, espelhos de retidão e perseverança, de quem sempre recebi amor e dedicação incondicionais.

Ao meu querido esposo Marco, meu companheiro, com quem compartilho meus sonhos.

Ao meu filho Lucas, que com seu sorriso ilumina cada segundo de minha existência.

A minha irmã Luciana, minha melhor amiga e confidente.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Professor Dr Silvio Alencar Marques, pela valiosa orientação deste trabalho e pela referência de seriedade e profissionalismo.

À minha co-orientadora, Professora Dra Mariangela Esther Alencar Marques, exemplo de competência e dedicação.

À Professora Dra Márcia Guimarães da Silva e Dra Denise Fecchio pelo apoio e confiança na realização desse trabalho.

À secretária Vânia A. Soler, pela atenção e gentilezas que sempre me dispensou quando a procurei.

Ao Dr Marcelo Padovani de Toledo Moraes pela padronização do anticorpo e sugestões para o trabalho.

Aos meus professores de Patologia da graduação Maria Cristina Furian Ferreira e Amilcar Castro de Mattos pela inspiração e incentivo imprescindíveis na minha escolha por essa especialidade.

Aos técnicos Marcos Franchi, Fernando Franchi, Celene, José, e Eduardo, e a auxiliar Rita dos laboratórios de Imunoistoquímica e Histologia pelo compromisso, seriedade e pontualidade no preparo e entrega das lâminas.

Ao Dr Flávio de Oliveira Lima pelo mapeamento e orientações sobre o TMA e aos técnicos Paulo R. Cardoso e Carlos C. Ramos pela realização do bloco e lâminas de TMA.

A equipe do laboratório Bio Check-Up pelo apoio e crescimento profissional.

Aos meus alunos e futuros colegas da UNIR e FIMCA, os quais tenho a honra de trocar conhecimentos e experiências.

Aos meus sogros Mário e Amélia Shibayama, pelo cuidado e carinho a nossa família.

Aos meus cunhados Marcelo e Ayumi Shibayama, Andréia e Jorge Carrasquilla, e, sobrinhos Bruno, Carla, Sayuri, e Kenzo que compreenderam os meus períodos de ausência e apoiaram em orações.

Ao meu futuro cunhado, Gustavo A. Denadai, que já é parte da família por toda atenção e disposição nos nossos eventos, com o Lucas e companhia sempre agradável.

Aos amigos Elisa Andrade Buzzo, Denise Jaqueto Pinheiro, Clayton Satoshi Okuno, Meyre Okuno, Mariane Sakaguti, Érika Teixeira de Freitas Vervloet, Juliana Carneiro Melo, Rosa Maria Harada Mirra, Raphael F. P. Villas Boas, Érico e Anna Carolina pela cumplicidade e carinho durante todos esses anos mesmo distantes.

A minha amiga Aline, pela valiosa contribuição na análise estatística e ao Rodrigo Srna Goulart pela paciência e bom humor.

Aos amigos Patrícia, Isabella e Alexandre Fabro e Simone A. Terra pelas estadias e prontidão sendo exemplos de lealdade e amizade nos momentos em que estive em Botucatu.

Ao Comitê de Ética da UNESP, pelo aprimoramento deste trabalho científico.

À CAPES e ao CNPq pela bolsa recebida durante alguns meses no decorrer do projeto.

RESUMO

Fundamentos: O equilíbrio homeostático do sistema imune é imprescindível para o controle e evolução do quadro clínico das neoplasias linfoides da pele e dos processos inflamatórios. Dentro desse equilíbrio imunológico, a função das células T reguladoras é controverso tanto nos casos de micose fungoide quanto nas dermatoses inflamatórias que são os principais diagnósticos diferenciais. O anti-FOXP3 é o imunomarcador mais específico para as células T reguladoras. **Objetivo:** Identificar e quantificar a presença de células T reguladoras através do marcador imunoistoquímico anti-FOXP3 em cortes histológicos de casos de micose fungoide em fases clínicas iniciais, e comparar com a presença ou não do mesmo marcador em casos de psoríase vulgar, dermatite eczematosa e líquen plano. **Métodos:** Foram estudadas 77 biópsias de 64 pacientes, sendo 30 casos de micose fungoide e 34 de dermatoses inflamatórias, consultados entre 1999 a 2014 no arquivo do serviço de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu – Universidade Estadual Paulista. As biópsias foram revistas e seus resultados imunoistoquímicos comparados de acordo com as categorias entre grupo de casos e grupo controle. **Resultados:** A classificação do escore epidérmico para o imunomarcador FOXP3 foi significativamente menor na micose fungoide que nas dermatoses inflamatórias ($p < 0,001$). A principal discrepância ocorreu com o líquen plano, no qual 90% foram FOXP3+ em mais de 50% dos linfócitos intraepidérmicos, enquanto que apenas 10% dos casos de micose fungoide alcançaram esses níveis de positividade. **Conclusões:** Embora a maioria dos diagnósticos das lesões iniciais de micose fungoide dependam principalmente da correlação clínica-histopatológica, a diferença estatisticamente significativa da proporção de FOXP3+ intraepidérmico comparando-se com as dermatoses inflamatórias permite a inclusão desse imunomarcador no painel imunoistoquímico para o auxílio diagnóstico nos casos suspeitos de micose fungoide e que não apresentem todas as características morfológicas para a definição diagnóstica.

Palavras chaves: Linfoma cutâneo; FOXP3; Imunoistoquímica; Linfócitos T; Micose Fungoide.

ABSTRACT

Background: The homeostatic balance of the immune system is essential for clinical evolution and control of cutaneous lymphoid neoplasias and inflammatory diseases. Regarding immunological balance the role of regulatory T cells remain unclear either in mycosis fungoides or their clinical differential diagnosis like inflammatory dermatosis. Anti-FOXP3 antibody is the most specific marker of regulatory T cells. **Objective:** To determine and quantify regulatory T cells using anti-FOXP3 antibody in histopathological samples of early lesions of mycosis fungoides and compare it with psoriasis vulgaris, eczematous dermatitis and lichen planus by a scoring system for FOXP3 expression. **Methods:** Data from 77 biopsies from 64 patients, 30 cases corresponding to mycosis fungoides and 34 to inflammatory dermatosis, observed between 1999 and 2014 at the Department of Pathology at Botucatu Medical School - Sao Paulo State University. Biopsies were reviewed and the FOXP3 labeled cells results compared according to cases or control group. **Results:** Intraepidermal FOXP3 positivity was significantly lower in mycosis fungoides than inflammatory dermatosis ($p < 0,001$). Especially significant was that 90% of lichen planus cases resulted in 50% or more of epidermal lymphocytes scored FOXP3+ whereas only 10% of mycosis fungoides group have reached this level. **Conclusions:** Despite the majority of early lesions of mycosis fungoides diagnosis depend mainly on clinical and histopathological correlation, the statistical significance of intraepidermal FOXP3 positivity comparing with inflammatory dermatosis allow us to include this antibody to help defining the diagnosis or giving support to suspect cases morphologically dubious of mycosis fungoides.

Keywords: Cutaneous lymphoma; FOXP3; Immunohistochemistry; T lymphocytes; Mycosis Fungoides.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 – Técnica de arranjo em matriz de amostras teciduais (TMA): bloco receptor contendo 68 amostras correspondentes a 34 casos.....32
- Figura 2 – 1)Mácula eritemato-descamativa de limites imprecisos, formato irregular localizada no tronco. 2)Mácula eritemato-hipocrômica com superfície de aspecto atrófico, de limites nítidos e mácula de menor diâmetro, eritemato-acastanhadas também de aspecto atrófico, localizadas no dorso. 3)Mácula de grande diâmetro, eritemato-violácea discretamente descamativa, de grande diâmetro, localizada no flanco. 4)Mácula hipocrômica e atrófica com descamação superficial localizada no tórax.....34
- Figura 3 – Sistema de escores para positividade da expressão do FOXP3 nos linfócitos intraepiteliais nos casos de micose fungoide; A)Escore 0 = 0 a 5%; B)escore 1+ = >5 a 25%; C)Escore 2+ = >25 a 50%; D)Escore 3+ = > 50 a 75%; E)Escore 4+ = >75%.IHQ, técnica da ABC, 400X.....36
- Figura 4 – Sistema de escores para positividade da expressão do FOXP3 nos linfócitos dérmicos nos casos de micose fungoide; A)Escore 0 = 0 a 5%; B)Escore 1+ = >5 a 25%; C)Escore 2+ = >25 a 50%; D)Escore 3+ = > 50 a 75%. IHQ, técnica da ABC, 400X.....36
- Figura 5 – Micose fungoide; A)Epidermotropismo com linfócitos alinhados na porção basal. HE, 100X; B)Epidermotropismo com linfócitos alinhados na porção basalcom ausência de expressão do FOXP3. IHQ, técnica da ABC, 100X; C)Microabscesso de Pautrier na epiderme. HE, 400X; D)Microabscesso de Pautrier com ausência de expressão do FOXP3. IHQ, técnica da ABC, 400X.....42
- Figura 6 – A)Dermatite subaguda espongíotica com vesículas e células inflamatórias. HE, 200X; B)Dermatite subaguda espongíotica e ausência de marcação para o FOXP3 (escore 0). IHQ, técnica da ABC, 200X.....42
- Figura 7 – A)Psoríase vulgar: infiltrado linfohistiocitário em derme papilar com exocitose de células inflamatórias para a epiderme. HE, 200X; B)Psoríase vulgar com expressão do FOXP3 em linfócitos intraepidérmicos (escore 3) e em derme papilar (escore 1). IHQ, técnica da ABC, 200X.....43
- Figura 8 – A)Líquen plano com infiltrado linfohistiocitário liquenoide. HE, 200X; B)Líquen plano com intensa expressão do FOXP3 em linfócitos da porção basal da epiderme (escore 4) e derme papilar (escore 3). IHQ, técnica da ABC, 200X.....43
- Figura 9 – Micose fungoide em fase tumoral; A)Infiltrado linfocitário atípico estendendo-se à derme reticular e ausência da expressão do FOXP3 (escore 0). IHQ, técnica da ABC, 50X; B)Ausência do FOXP3 nos linfócitos epidérmicos, IHQ, técnica da ABC, 400X; C)Ausência da expressão do FOXP3 nos linfócitos dérmicos (escore 0). IHQ, técnica da ABC, 400X.....45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Número de biópsias realizadas para o diagnóstico de certeza de micose fungoide.....	34
Tabela 2 – Escore de FOXP3 segundo casos e por dermatose inflamatória.....	37
Tabela 3 – Escores do FOXP3 separadas em casos e controles.....	38
Tabela 4 – Escore agrupado por intensidade de imunomarcção FOXP3 segundo casos e dermatoses inflamatórias	38
Tabela 5 – Escore agrupado por intensidade de imunomarcção FOXP3 segundo casos e controles.....	39
Tabela 6 – Escore do FOXP3 nos casos de micose fungoide em fase clínica inicial e em fase tumoral segundo grupos de escore.....	40

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	9
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	12
2.1 Conceituação	12
2.2 Aspectos Históricos.....	15
2.3 Aspectos Epidemiológicos dos Linfomas Cutâneos Primários.....	15
2.4 Etiologia e Fisiopatologia da Micose Fungoide.....	16
2.5 Micose Fungoide e Sistema Imunológico	17
2.6 Enfermidades Inflamatórias Diferenciais da Micose Fungoide em Estádios Iniciais	19
2.7 Aspectos Anatomopatológicos.....	21
2.8 Aspectos Imunoistoquímicos e Moleculares.....	23
Referências.....	25
3 MATERIAL E MÉTODOS	31
4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	33
5 RESULTADOS	33
6 DISCUSSÃO.....	40
7 CONCLUSÃO	45
REFERÊNCIAS.....	47
ANEXO I.....	50
ANEXO II.....	51
ANEXO III – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa	54

POSITIVIDADE DO IMUNOMARCADOR FOXP3 EM CÉLULAS T REGULADORAS
EM LESÕES DE MICOSE FUNGOIDE EM FASES CLÍNICAS INICIAIS E EM
DERMATOSES INFLAMATÓRIAS COMO FATOR AUXILIAR PARA O
DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

Thamy Yamashita ¹, Mariangela E. A. Marques ², Silvio A. Marques³

- 1- Médica Patologista, Programa de Pós-graduação em Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu – Universidade Estadual Paulista
- 2- Professora Livre Docente do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu – Universidade Estadual Paulista
- 3- Professor Livre Docente do Departamento de Dermatologia da Faculdade de Medicina de Botucatu – Universidade Estadual Paulista

Trabalho realizado no Hospital de Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu – Universidade Estadual Paulista (UNESP)

Autor correspondente:

Dr. Silvio A. Marques

Departamento de Dermatologia da Faculdade de Medicina de Botucatu – Universidade Estadual Paulista

Distrito de Rubião Júnior, CEP: 18618-970, Botucatu, São Paulo, Brazil.

Telefone: +55 (14) 3882-4922 Fax: +55 (14) 3882-4922

e-mail: smarques@fmb.unesp.br

Não há conflito de interesses.

De acordo com a revista Anais Brasileiros de Dermatologia.

1 INTRODUÇÃO

Linfomas cutâneos primários (LCP) são definidos como linfomas não-Hodgkin presentes na pele e sem que se demonstre localização extracutânea primária no momento do diagnóstico (Willemze & Meijer, 2006). A classificação dos LCP é produto da cooperação da *World Health Organization* (WHO) e da *European Organization of Research and Treatment of Cancer* (EORTC), publicada em 2005 sob o título de “*WHO-EORTC Classification for Cutaneous Lymphomas*” (Willemze et al., 2005) e reafirmada pela publicação “*WHO Classification of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*” de 2008 (Ralfkiaer et al., 2008).

A classificação WHO-EORTC distingue dois grandes grupos de LCP: os linfomas com origem no linfócito T com residência na pele, denominados de “linfoma cutâneo de células T” (LCCT) e, os com origem no linfócito B, e denominados de “linfoma cutâneo de células B” (LCCB) (Willemze et al., 2005, Ralfkiaer et al., 2008). A esses se somam os linfomas cutâneos de origem nas células *Natural Killer* (NK) e os linfomas provisoriamente não classificáveis segundo a célula de origem (Olsen et al., 2007, Cerroni et al., 2009).

Os LCCT são constituídos por um grupo heterogêneo de linfomas cutâneos que apresentam comportamento clínico distinto dos linfomas sistêmicos, ainda que apresentando subtipo histológico semelhante. E, mesmo entre si, os LCCT apresentam extrema variedade na expressão clínica, de máculas a tumores, de indolentes a agressivos, tanto no comportamento biológico, quanto nos aspectos histológicos, imunofenotípicos e no prognóstico.

Os subtipos indolentes de LCCT reúnem a micose fungoide (MF) e suas variantes, o LCP de células T de grandes células anaplásicas, a papulose linfomatoide, o linfoma subcutâneo de células T paniculite-símile e o linfoma cutâneo de células T CD4⁺ de pequenas e médias células pleomórficas. Os subtipos mais agressivos reúnem a síndrome de Sézary (SS), o LCP de células-T/NK tipo nasal, o LCP agressivo de células-T CD8⁺ e, o LCP de células-T inespecífico. Dentre os linfomas cutâneos primários mais de 65% são do tipo células T, 25% são constituídos por células B e em torno de 10% são inespecíficos (Ralfkiaer et al., 2008, Rizyl et al., 2008).

O subtipo predominante de linfoma cutâneo primário da pele é denominado de micose fungoide (MF) que corresponde ao linfoma cutâneo com origem no linfócito T periférico epidermotrópico que expressa o receptor de células T (TCR) com subunidades $\alpha\beta^+$ e com imunofenótipo CD4⁺, conhecido como linfócito T de memória (CD45RO⁺), constituinte do

sistema de imunovigilância da pele. É um linfoma cutâneo de pequenos e médios linfócitos circunvolutos com tendência a invadir a epiderme em seus estágios iniciais (Guitart et al., 2001, Keehn et al., 2007, Elder et al., 2009)

A etiologia da MF é incerta, com duas hipóteses principais. Primeiro, sugere-se que a persistência de determinado estímulo antigênico induza um processo inflamatório dérmico crônico com ativação das células T que poderiam dar origem a um clone maligno de células T (Binazzi, 1977, Willemze e al., 2005).

A segunda hipótese está ligada a ação oncogênica de algum vírus, como HTLV1, HTLV2, EBV e CMV. Porém ainda não foram encontrados antígenos específicos, carcinógenos ou partículas virais específicas, que fossem essenciais para o desenvolvimento da MF (Willemze e al., 2005, Rizyl et al., 2008).

Nas fases clínicas iniciais da MF a lesão corresponde a máculas (“*patch*”) e é de difícil diagnóstico e pode se apresentar com aspecto que remete a diferenciais clínicos como eczema crônico, hanseníase indeterminada, parapsoríase, líquen esclero-atrófico e pitíriase alba (Baum & Liu, 2011). Nessa fase tanto a lesão clínica como a histopatologia podem ser inespecíficas e por vezes o diagnóstico de MF ocorre anos após a primeira biópsia.

A denominação ou conceituação da micose fungoide clássica (tipo Alibert) se restringe àquela com evolução clássica de máculas (*patches*) posteriormente placas, a seguir tumores e por fim sistematização. O prognóstico da MF clássica, com início das lesões se expressando por máculas (*patches*) ou placas (estádio I-II) é bom, sendo que a maioria dos pacientes apresentam curso prolongado da enfermidade com curso indolente do quadro desde que submetido a intervenções adequadas. Tal constatação torna o diagnóstico precoce da MF como elemento crucial para o tratamento com sucesso.

Obstáculo ao sucesso terapêutico são os meios de evasão imunológica das células tumorais. Nesse contexto o microambiente da pele está diretamente associado aos principais mecanismos nos quais o clone maligno de células T dissimula o sistema imunológico permitindo o surgimento da MF (Jawed et al., 2014).

Embora haja controvérsias nos diferentes estudos sobre a influência das células T reguladoras (Treg) que possam estar envolvidas na patogênese, evolução e sobrevida dos pacientes com MF (Gjerdrum et al., 2007, Solomon & Magro, 2008, Fujimura et al., 2008), sabe-se que as células Treg são uma população de células capazes de suprimir a resposta imune interferindo nos mecanismos de auto-tolerância imunológica (Sakaguchi et al., 1995).

Há evidências de que a supressão imuno-mediada por células T reguladoras é a maneira pela qual as células tumorais podem evadir do sistema imunológico (Berger et al.,

2005). Existem estudos que associam o aumento do número de células T reguladoras a um pior prognóstico e redução da sobrevida em diferentes tipos de carcinoma (Beyer et al., 2006).

Carreras et al., (2006) e Gjerdrum et al., (2007), sugerem que o infiltrado de células Treg nos linfomas possa suprimir não apenas o infiltrado de células T citotóxicas, mas inclusive o de células malignas, tornando o estudo do infiltrado de Treg em linfomas ainda mais complexo que nos tumores sólidos.

As células T reguladoras CD4 + CD25+ correspondem de 5 a 10% das células T periféricas CD4 + e expressam o marcador FOXP3, que é uma proteína supressora transcricional da subfamília dos *forkhead box P3* e é considerado o marcador mais confiável para Tregs (Zou, 2006).

Há perda da expressão do FOXP3 à medida em que se avança em termos de gravidade do quadro ou para estádios clínicos mais avançados (Fried & Cerroni, 2012) mas, essa perda de expressão pode se manifestar em fases iniciais da MF quando comparadas com dermatoses inflamatórias que fazem diagnóstico diferencial histológico, e mesmo clínico, com a MF (Wada et al., 2010). Ou seja, a expressão da imunomarcagem estatisticamente menor do FOXP3 na MF comparada com dermatoses inflamatórias como grupo controle poderia ser subsídio ao diagnóstico anatomo-patológico da enfermidade (Wada et al., 2010).

A constatação de que alterações histopatológicas da MF nas fases iniciais são discretas, podendo ser superponíveis às encontradas nas lesões inflamatórias e, que os critérios histológicos são, por vezes, subjetivos, se torna importante que se padronize de forma objetiva os principais critérios diagnósticos histológicos e imunoistoquímicos dessa entidade, na premissa que o diagnóstico precoce tem impacto no prognóstico do paciente.

Frente a essas observações os autores do presente trabalho buscaram auxiliar no esclarecimento sobre a patogênese da MF e sua relação com o sistema imune. Comparar de forma semiquantitativa a presença de linfócitos T reguladores, através do marcador FOXP3 nos casos de MF em fases clínicas iniciais e a expressão do FOXP3 nas principais dermatoses inflamatórias que são os principais diagnósticos diferenciais da MF nesse estágio.

2 REVISÃO DA LITERATURA

DIAGNÓSTICO DA MICOSE FUNGOIDE EM FASES CLÍNICAS INICIAIS

2.1 Conceituação

Linfomas cutâneos primários (LCP) são definidos como linfomas não-Hodgkin presentes na pele e sem que se demonstre localização extracutânea primária no momento do diagnóstico (Willemze & Meijer, 2006). A classificação dos LCP é produto da cooperação da *World Health Organization* (WHO) e da *European Organization of Research and Treatment of Cancer* (EORTC), publicada em 2005 sob o título de “WHO-EORTC Classification for Cutaneous Lymphomas” (Willemze et al., 2005) e reafirmada pela publicação “WHO Classification of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues” de 2008 (Ralfkiaer et al., 2008).

A classificação WHO-EORTC distingue dois grandes grupos de LCP: os linfomas com origem no linfócito T com residência na pele, denominados de “linfoma cutâneo de células T” (LCCT) e, os com origem no linfócito B, e denominados de “linfoma cutâneo de células B” (LCCB) (Willemze et al., 2005, Ralfkiaer et al., 2008). A esses se somam os linfomas cutâneos de origem nas células *Natural Killer* (NK) e os linfomas provisoriamente não classificáveis segundo a célula de origem (Olsen et al., 2007, Cerroni et al., 2009).

Os LCCT são constituídos por um grupo heterogêneo de linfomas cutâneos que apresentam comportamento clínico distinto dos linfomas sistêmicos, ainda que apresentando subtipo histológico semelhante. E, mesmo entre si, os LCCT apresentam extrema variedade na expressão clínica, de máculas a tumores, de indolentes a agressivos, tanto no comportamento biológico, quanto nos aspectos histológicos, imunofenotípicos e no prognóstico.

Os subtipos indolentes de LCCT reúnem a micose fungoide (MF) e suas variantes, o LCP de células T de grandes células anaplásicas, a papulose linfomatoide, o linfoma subcutâneo de células T paniculite-símile e o linfoma cutâneo de células T CD4⁺ de pequenas e médias células pleomórficas. Os subtipos mais agressivos reúnem a síndrome de Sézary (SS), o LCP de células-T/NK tipo nasal, o LCP agressivo de células-T CD8⁺ e, o LCP de células-T inespecífico. Dentre os linfomas cutâneos primários mais de 65% são do tipo células T, 25% são constituídos por células B e em torno de 10% são inespecíficos (Ralfkiaer et al., 2008, Rizyl et al., 2008).

O subtipo predominante de linfoma cutâneo primário da pele é denominado de micose fungoide (MF) que corresponde ao linfoma cutâneo com origem no linfócito T periférico epidermotrópico que expressa o receptor de células T (TCR) com subunidades $\alpha\beta^+$ e com imunofenótipo $CD4^+$, conhecido como linfócito T de memória ($CD45RO^+$), constituinte do sistema de imunovigilância da pele. É um linfoma cutâneo de pequenos e médios linfócitos circunvolutos com tendência a invadir a epiderme em seus estágios iniciais (Guitart et al., 2001, Keehn et al., 2007, Elder et al., 2009)

A MF representa menos de 1% da totalidade dos linfomas não-Hodgkin, porém é o linfoma cutâneo mais comum. Classicamente apresenta evolução indolente e, em princípio, bom prognóstico (Ralfkiaer et al., 2008, Rizyl et al., 2008).

São reconhecidas na classificação WHO-EORTC a forma clássica de MF e três variantes: “folicular”, “reticuloide pagetoide” e a “cútis laxa granulomatosa”. Outros subtipos têm sido referidos na literatura devido a características clínicas e/ou histológicas peculiares, tais como: “hipopigmentada/ hiperpigmentada”, “eritrodérmica”, “poiquilodérmica”, “pigmentada púrpura-símile”, “bolhosa/disidrótica”, variedade “papular” e a “invisível” (Ralfkiaer et al., 2008, Cerroni et al., 2009). A variante leucêmica da MF é denominada síndrome de Sézary com expressão clínica, anatomopatológica e evolutiva distintas (Willemze et al., 2005, Cerroni et al., 2009).

Das variantes da MF segundo a WHO-EORTC a foliculotrópica é a mais comum (*folliculotropic mycosis fungoides*). A lesão folicular pode preceder, acompanhar ou manifestar-se posteriormente à micose fungoide clássica.

A localização mais comum da variante folicular é segmento cefálico com clínica papulosa, nodular ou acneiforme, ou tipo alopecia mucinosa. Sugere-se que a MF folicular tenha prognóstico mais grave quando comparado com a MF clássica (Sampaio & Rivitti, 2007) e, isto seria consequente à localização mais profunda do acometimento específico e, portanto, menos acessível ao tratamento clássico com corticoterapia tópica ou com o esquema PUVA.

A variante denominada reticulose pagetoide (doença de Woringer – Kolopp) é rara e manifesta-se por lesão única, solitária, mais frequente em jovens e expressa-se do ponto de vista clínico por placa hiperkeratósica em geral nos membros inferiores e de evolução extremamente indolente. A histopatologia é característica pois há acantose, hiperparaceratose e intenso epidermotropismo com aspecto pagetoide (Steffen, 2005).

A variante cútis laxa granulomatosa (*granulomatous slack skin*) é bastante rara e caracteriza-se por lesões que imitam cútis laxa, com pele pendula, redundante, nas áreas de

dobras, particularmente axilas e região ínguino-crural. A histologia mostra epidermotropismo de linfócitos atípicos, que não estão presentes em todos os casos, associado a granulomas dérmicos. O infiltrado granulomatoso pode ser exuberante e, em geral, o diagnóstico de certeza é tardio (Willemze et al., 2005, Magro et al., 2007, Smoler et al., 2008, Cerroni et al., 2009).

Deve-se diferenciar a *cútis laxa granulomatosa* da variante granulomatosa observada em outros linfomas cutâneos e o diferencial reside no quadro clínico dermatológico peculiar da *cútis laxa granulomatosa* (Ralfkiaer et al., 2008).

A MF eritrodérmica é variante rara e distingue-se da síndrome de Sézary por não preencher as exigências diagnósticas deste, como por exemplo o número mínimo de 1000 células de Sézary/mm³ circulantes ou população CD4⁺ circulantes em número 10 vezes maior que células CD8⁺. Eritrodermia se caracteriza por eritema generalizado associado a descamação e que comprometa pelo menos 75% da superfície corporal e com duração de pelo menos um mês. O quadro da MF eritrodérmica tende a ser infiltrativo, poupar áreas de dobras, pode ter áreas de acúmulo de pápulas e cursa com hiperqueratose palmo-plantar e é, habitualmente, intensamente pruriginoso. A evolução é relativamente rápida para o desenvolvimento de nódulos e tumores específicos do linfoma, o que torna o prognóstico desse subtipo clínico mais reservado. Na prática clínica a eritrodermia da MF tem que ser diferenciada da síndrome de Sézary e de eritrodermias de causa inflamatória que são as mais frequentes.

A denominação ou conceituação da micose fungoide clássica (tipo Alibert) se restringe àquela com evolução clássica de máculas (*patches*) posteriormente placas, a seguir tumores e por fim sistematização. O prognóstico da forma macular (*patch*) ou placas é bom (estádio I-II), sendo que a maioria dos pacientes apresentam curso prolongado da enfermidade com curso indolente do quadro desde que submetido a intervenções adequadas. Tal constatação torna o diagnóstico precoce da MF como elemento crucial para o tratamento com sucesso.

Porém, durante a evolução, pode ocorrer transformação para a fase de tumores e a transformação histológica para grandes células, caracterizadas pelo diâmetro da célula neoplásica de quatro vezes maior que o linfócito normal e em quantidade que excede 25% do infiltrado e até mesmo formando agregados. Tal transformação para grandes células é descrita e ocorre entre 8% a 55% dos casos e, em geral, estão associadas ao mal prognóstico (Barberio et al., 2007, Hallermann et al., 2007).

2.2 Aspectos Históricos

A micose fungoide foi descrita pela primeira vez em 1806 por Alibert na França, publicada pelo autor como “Pian fungoides” em 1814 e a terminologia “Mycosis fungoides” utilizada apenas a partir de 1832 ainda por Alibert (Ralfkiaer et al., 2008). Em 1870, Bazin descreveu a progressão segundo a história natural da enfermidade e definiu os seus estágios, ainda hoje clássicos: macular (na língua inglesa referido como *patch*), em placas, tumoral e disseminado sistêmico.

Em 1885 Vidal e Brocq introduziram o termo “Micose fungoide tumoral d’*emblée*”, para casos com tumorações linfomatosas cutâneas praticamente desde o início, sem apresentar lesões precursoras (Willemze & Meijer, 2006). Atualmente, esse antigo subtipo clínico de MF passou a corresponder ao “linfoma cutâneo de células T periférico não especificado”, deixando de ser considerado variante da MF (Ralfkiaer et al., 2008).

Em 1892 descreveu-se a forma eritrodérmica da MF, caracterizada por eritema, descamação e infiltração generalizada da pele e, em 1938 a descrição da síndrome de Sézary (Ralfkiaer et al., 2008). A “reticulose pagetoide” foi descrita em 1939, como lesão solitária, hiperkeratósica, descrita por Woringer-Kolopp.

A denominação “linfoma cutâneo de células T” (LCCT) surgiu em 1975 para englobar a MF e variantes e posteriormente passou a abranger outros tipos de LCP e que inclui o espectro dos LCP CD30⁺, o linfoma subcutâneo primário de células-T paniculite-símile, o LCP de células NK/T tipo nasal e LCP de células-T não classificáveis (Ralfkiaer et al., 2008, Rizyl et al., 2008).

2.3 Aspectos Epidemiológicos dos Linfomas Cutâneos Primários

Os LCP constituem-se no segundo mais frequente tipo de linfoma não - Hodgkin de localização extranodal após os linfomas de localização gastrointestinal. Os LCP apresentam incidência anual, estimada, na Europa de 1/100.000 habitantes (Willemze et al., 2005)

Ainda na Europa os LCCT constituem-se em 65% a 80% do total de LCP. A MF e variantes correspondem a mais de 50% dos casos de linfomas primários da pele e a aproximadamente 90% do total dos linfomas cutâneos de células T (Willemze & Meijer, 2006, Willemze et al., 2005, Willemze & Dreyling, 2009)

Nos Estados Unidos, no período compreendido entre 1973 e 1992 a incidência de MF foi de 0,36 casos/100.000 habitantes (Weinstock & Gardstein, 1999). A incidência foi maior

na população negra em relação à branca numa proporção de 1,7/1 e entre asiáticos/ brancos foi de 0,6/1 (Weinstock & Gardstein, 1999). No período estudado a mortalidade foi decrescente para os casos de MF especificamente e considerada como decorrente do diagnóstico mais precoce dos casos (Weinstock & Gardstein, 1999).

Em estudo realizado na Suíça, no período de 1990 a 2009, foram identificados 263 casos de LCP, com média de idade dos pacientes de 59 anos e 1/1,4 na relação entre os sexos masculino/feminino (M/F) (Jenni et al., 2011). Os LCCT somaram 190 casos (72,2%) e dentre esses a MF correspondeu a 60% (114/190). No período estudado a incidência de MF mostrou-se estável, a incidência de SS decresceu de 17% para 7% dos casos e a incidência de linfomas CD30+ cresceu de 7% para 18% do total de casos (Jenni et al., 2011).

No Brasil os dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA) indicam incidência estimada para o ano de 2014 de 9790 casos novos para o conjunto dos casos de linfomas não-Hodgkin, o que equivale a aproximadamente a 5,0/100.000 habitantes, e que inclui os LCP, porém, a publicação do INCA não faz distinção quanto aos diferentes subtipos de linfoma não-Hodgkin (INCA, 2014).

A MF, especificamente, acomete adultos de ambos os sexos, com relação M/F entre 1,6 a 2/1, geralmente acima dos 50 anos, mas com incidência crescente em crianças e adolescentes (Willemze et al., 2005).

O percentual de sobrevida no quinto ano de acompanhamento oscila entre 16% a 100% a depender do subtipo clínico de LCCT. E, entre 80% a 100% quando se considera MF e variantes, excetuando-se a SS, que apresenta prognóstico mais reservado (Willemze et al., 2005, Edelson, 1980, Magro & Dyrsen, 2008).

2.4 Etiologia e Fisiopatologia da Micose Fungoide

A etiologia da MF é incerta, com duas hipóteses principais. Primeiro, sugere-se que a persistência de determinado estímulo antigênico induza um processo inflamatório dérmico crônico com ativação das células T que poderiam dar origem a um clone maligno de células T (Binazzi, 1977, Willemze e al., 2005).

A segunda hipótese está ligada a ação oncogênica de algum vírus, como HTLV1, HTLV2, EBV e CMV. Porém ainda não foram encontrados antígenos específicos, carcinógenos ou partículas virais específicas, que fossem essenciais para o desenvolvimento da MF (Willemze e al., 2005, Rizyl et al., 2008).

A MF é um linfoma não-Hodgkin decorrente da expansão clonal de linfócitos CD4⁺, auxiliares, de memória (CD45RO⁺) residentes na pele e responsáveis pela vigilância imunológica. Na maioria dos casos de MF e síndrome de Sézary a expansão clonal e a ativação de células CD4⁺ resultam na liberação de citocinas e fatores de crescimento que estimulam a proliferação de queratinócitos e a inflamação cutânea (Beyer et al., 2011).

Alterações citogenéticas têm sido observadas utilizando-se hibridização genômica comparativa e hibridização com fluorescência “in situ” (FISH). Mutações afetando os genes CDKN2A, FAS, JUNB e alterações na sinalização via Janus quinase e ativadores de transcrição têm sido identificados em subgrupos de casos de MF (Van Doorn et al., 2009). Entretanto as alterações de genética molecular associadas à patogênese da MF ainda não estão elucidadas.

Estudos demonstram a presença dos receptores de quimiocinas nas células T malignas de MF com fenótipo de células T de memória, as quais ficam recirculando na pele e atuam como fatores epidermotrópicos contínuos. E, na medida em que a doença progride para estádios mais avançados observa-se redução desses mediadores químicos, o que justificaria a perda do epidermotropismo e possível disseminação das células tumorais para o sangue periférico e linfonodos (Beyer et al., 2011).

2.5 Micose Fungoide e Sistema Imunológico

A maturação dos linfócitos T ocorre em etapas sequenciais que envolvem a recombinação somática e expressão do receptor de células T (TCR), proliferação das células com expressão dos co-receptores CD4 e CD8 e, seleção positiva e negativa induzida pela apresentação de antígenos próprios no timo (Stutman, 1978). Embora apenas 5% das células que entram no timo tornam-se linfócitos T maduros, nesse processo de seleção tímica há um escape de células T auto-reativas para a periferia.

Tendo em vista os meios de evasão imunológica observados também no comportamento das células tumorais, torna-se um campo interessante para numerosos estudos, pois continuam a ser um obstáculo ao sucesso terapêutico (Berger et al., 2005). Nesse contexto o microambiente da pele está diretamente associado aos principais mecanismos nos quais o clone maligno de células T dissimula o sistema imunológico permitindo o surgimento da MF (Jawed et al., 2014).

Dentre eles está a inibição da maturação das células dendríticas pelas células tumorais através da IL-10, que é encontrada na MF (Asadullah et al., 1996). E, ao invés de

desencadear uma resposta imune, a interação de células T com as células dendríticas imaturas induz a uma tolerância aos antígenos tumorais (Streinman, 2007). Em contrapartida, o aumento na quantidade de células T citotóxicas CD8⁺ reativas são encontradas nas lesões iniciais de MF, secundárias a um recrutamento pelas células dendríticas maduras, podendo contribuir a uma resposta antitumoral (Vermeer et al., 2001, Goteri et al., 2003).

As células T citotóxicas CD8⁺ controlam em parte a proliferação de células T malignas através da secreção de citocinas como IFN- α e IFN- γ e pela citotoxicidade direta contra antígenos expressos pela célula tumoral (Vowels et al., 1994, Rook et al., 2003, Berger et al., 1996, Bagot et al., 1998, Vermeer et al., 2001). Durante a progressão da MF para estádios mais avançados desenvolve-se uma severa imunodeficiência na imunidade celular associada a diminuição das células T CD8⁺ ativadas e células NK (Asadullah et al., 1997, Wysocka et al., 2004, Bouaziz et al., 2005).

Há evidências de que a supressão imuno-mediada por células T reguladoras é a maneira pela qual as células tumorais podem evadir do sistema imunológico. Existem estudos que associam o aumento do número de células T reguladoras a um pior prognóstico e redução da sobrevida em diferentes tipos de carcinoma (Beyer et al., 2011). Porém Gjerdrum et al., (2007) sugerem que o aumento das células Treg na MF é considerada um fator de melhor prognóstico, assim como relatado por Carreras et al., (2006) um aumento da sobrevida dos pacientes com linfoma folicular.

Carreras et al., (2006) e Gjerdrum et al., (2007) sugerem que o infiltrado de células Treg nos linfomas possa suprimir não apenas o infiltrado de células T citotóxicas, mas inclusive o de células malignas, tornando o estudo do infiltrado de Treg em linfomas ainda mais complexo que nos tumores sólidos.

As células T reguladoras (*Treg*) são definidas como uma população de células que podem influenciar outros tipos celulares suprimindo a resposta imune (Zou, 2006). São responsivas aos auto-antígenos, agentes infecciosos e antígenos pós-transplante, pois suprimem a expansão e ativação de células T auto-reativas que escaparam da seleção negativa tímica (Sakaguchi et al, 1995).

As células T reguladoras CD4⁺ CD25⁺ correspondem de 5 a 10% das células T periféricas CD4⁺ e expressam o marcador FOXP3, que é uma proteína supressora transcricional da subfamília dos *forkhead box P3* e é considerado o marcador mais confiável para Tregs (Zou, 2006). Sugere-se que células Treg possam ter duas origens, a Treg natural CD4⁺ CD25⁺ que se desenvolve no timo e a célula Treg induzida, a qual surge a partir de células T naive CD4⁺ CD25⁻ periféricas, na presença de altos níveis de TGF- β e IL-2.

Embora tenham origens diferentes, tanto as Tregs naturais quanto as Tregs induzidas têm função e fenótipo similares (Sakaguchi et al., 2010, Curotto de Lafaille & Lafaille, 2009).

Há perda da expressão do FOXP3 à medida em que se avança em termos de gravidade do quadro ou para estádios clínicos mais avançados (Fried & Cerroni, 2012). Dessa forma, percentual expressivo das células Tregs perdem sua capacidade de autorregular e de suprimir a proliferação de células CD4⁺ e de expressar o FOXP3 nas fases mais avançadas da MF (Tiemessen et al., 2006).

Mas, essa perda de expressão pode se manifestar em fases iniciais da MF quando comparadas com dermatoses inflamatórias que fazem diagnóstico diferencial histológico, e mesmo clínico, com a MF (Solomon & Magro, 2008, Wada et al., 2010). Ou seja, a expressão da imunomarcagem estatisticamente menor do FOXP3 na MF comparada com dermatoses inflamatórias como grupo controle poderia ser subsídio ao diagnóstico anatomo-patológico da enfermidade (Wada et al., 2010).

Além desse mecanismo de evasão imune, Brenner et al., (2008) descrevem que a interação da molécula de superfície Fas com seu ligante (FasL) permite a eliminação de células malignas por apoptose, o que previne uma reação imune persistente. Na análise imunoistoquímica de biópsias cutâneas de MF nas fases iniciais constatou-se Fas⁺ e durante a progressão para a fase tumoral notou-se diminuição na expressão de Fas (Zoi-Toli et al., 2000).

2.6 Doenças Inflamatórias Diferenciais da Micose Fungoide em Estádios Iniciais

Em trabalho realizado por Yamashita (2011) em 67 pacientes estudados clínica e histologicamente como suspeitos de micose fungoide em apenas oito casos (11,9%) a hipótese de MF era a única sugestão diagnóstica constante na requisição do anatomopatológico.

Os demais casos listavam como hipótese, além da MF, particularmente eczema crônico ou eczema de contato, mas também com frequência: psoríase, parapsoríase, hanseníase, pitiríase alba, líquen plano, farmacodermia, xerose cutânea, entre outras. Dessas considera-se como real dificuldade diagnóstica do ponto de vista clínico, os quadros eczematosos, a parapsoríase, certas apresentações clínicas da psoríase sob tratamento, a pitiríase alba e como diferencial predominantemente histológico o líquen plano. Pela frequência clínica e pela disponibilidade de número de biópsias habitualmente disponíveis, as mais importantes são os eczemas, a psoríase e o líquen plano.

Eczema é doença inflamatória que se expressa de forma aguda a crônica, com patogênese muitas vezes complexa segundo o subtipo de eczema considerado. No subtipo mais comum da prática clínica que é o eczema de contato, seja por irritação primária ou por sensibilização, a lesão pode se tornar crônica, ser pouco responsiva à terapêutica com corticoesteróides tópicos e vir a apresentar aspecto de mácula ou mesmo placa de coloração eritematosa de diversas tonalidades, com descamação e prurido de intensidade variável.

Nessas circunstâncias o diagnóstico clínico diferencial mais próximo, particularmente para os eczemas recalcitrantes, passa a ser a micose fungoide. Portanto, na prática clínica lesões suspeitas de eczema crônico com diferencial para micose fungoide, ou vice-versa, constituem-se nos maiores desafios para correta definição diagnóstica.

Dentre as alterações histopatológicas das doenças do grupo eczema estão a espongiose epidérmica e exocitose de linfócitos características de dermatite espongiótica. A dermatite espongiótica tradicionalmente é subclassificada em aguda, na qual há formação de vesículas e bolhas, que podem simular microabscessos de Pautrier; a forma subaguda, caracterizada pela hiperplasia epidérmica, com diferentes graus de acantose podendo ter padrão psoriasiforme e com frequência apresenta vesículas e na forma crônica nota-se na epiderme hiperplasia psoriasiforme, hiperqueratose, hipergranulosa e redução da espongiose e, fibrose na derme papilar.

Psoríase é enfermidade inflamatória crônica da pele e também das articulações, de base genética, imunomediada e com grande variabilidade de expressão clínica. É altamente prevalente, acometendo indivíduos de ambos os sexos particularmente acima dos 30 anos de idade. Na sua manifestação mais comum o paciente apresenta lesões em placa de coloração eritematosa com tonalidade do eritema vivo à cor salmão com descamação aderidas tipo micácea.

Quando em tratamento tópico ou sistêmico as lesões reduzem sua atividade inflamatória e a lesão pode assumir o aspecto de mácula, reduzir o componente inflamatório e, portanto, reduzir a intensidade do eritema e perder parte da descamação. Nessas circunstâncias a aparência clínica pode simular lesões iniciais da MF e se a história clínica ou mesmo o exame clínico forem menos detalhados o paciente pode ser submetido à biópsia com diversas hipóteses entre elas a micose fungoide. Circunstância adicional de paciente submetido à biópsia com diversas hipóteses listadas, incluindo a micose fungoide, é o paciente com formas eritrodérmicas da psoríase em fase de esclarecimento diagnóstico.

Línquen plano é enfermidade de curso crônico, de etiologia mal definida, com diversos subtipos clínicos, de maior incidência entre os 30 e 60 anos de idade e que, com

frequência, necessita do exame anatomopatológico para confirmação diagnóstica. Na sua apresentação clássica, caracterizada pela presença de pápulas poligonais e exibindo o fenômeno de Koebner o líquen plano não apresenta dificuldades clínicas maiores para o diagnóstico. No entanto, formas clínicas menos comuns, como o líquen plano actínico, atrófico, hipertrófico, ou anular, e ainda quando parcialmente tratado por corticoesteróides tópicos, impõem dificuldades para o preciso diagnóstico clínico e, em certos casos, também histopatológico.

Cerroni et al (2005), descreveram alterações focais como degeneração vacuolar dos queratinócitos basais em 59% dos casos de MF em fases clínicas iniciais e em 4% uma degeneração vacuolar extensa na junção dermoepidérmica, simulando dermatite de interface. Por essas características é em certos casos listado como diferencial clínico para MF e a mesma dificuldade pode ocorrer quanto à definição anatomopatológica.

2.7 Aspectos Anatomopatológicos

A histopatologia da MF depende do estágio em que é realizada a biópsia, e, quando esta é realizada em estádios iniciais (manchas e placas), os achados microscópicos são diversas vezes inespecíficos e se sobrepõem ao de outras doenças inflamatórias ou não neoplásicas (Nashan et al., 2007, Liu & Baum, 2011). Além disso, o tratamento clínico nessas fases pode ter sido empírico com o uso de corticoesteroides tópicos, sendo necessário à descontinuidade do tratamento cerca de 2 a 4 semanas antes da realização da biópsia, pois, sob corticoterapia, os achados histológicos da MF podem ficar mais brandos, dificultando ainda mais o diagnóstico de certeza da MF (Pimpinelli et al., 2005).

No estágio de mancha ou mácula da MF, com a lesão bem estabelecida do ponto de vista clínico, observa-se infiltrado de linfócitos margeando a camada basal e um epidermotropismo de células isoladas. A maioria dessas células são linfócitos pequenos e diferenciados com núcleos discretamente arredondados ou cerebriformes. Sanchez e Ackermann (1979) descrevem a presença de linfócitos isolados ou agrupados em pequenas coleções na epiderme na ausência de espongiose, conhecido como epidermotropismo desproporcional.

A epiderme pode apresentar acantose, hiperqueratose ou sinais de dano da camada basal (incontinência pigmentar) e edema. Na derme pode observar-se proeminência de vênulas pós-capilares e infiltrado contendo eosinófilos, plasmócitos, macrófagos e células dendríticas dérmicas e, a fibrose da derme papilar. A intensidade do infiltrado é variável

sendo crescente à medida que a lesão evolui e se aproxima do aspecto clínico de lesão em placa (Pimpinelli et al., 2005, Elder et al., 2009).

Na forma clínica em placa bem constituída, o aspecto anatomopatológico é de epiderme com certo grau de acantose, de padrão psoriasiforme, com espongiose rara ou ausente. O infiltrado de linfócitos com núcleos cerebriformes é denso, subepidérmico, por vezes em faixa. O epidermotropismo é mais proeminente e o microabscesso de Pautrier é encontrado em um terço dos casos (Pimpinelli et al., 2005, Elder et al., 2009). O infiltrado dérmico apresenta maior número de células atípicas, com núcleos irregulares e cerebriformes. Observa-se também a presença de linfócitos e plasmócitos no infiltrado dérmico (Elder et al., 2009).

Cerroni et al (2005) apresentaram a maior casuística até o momento, de 427 pacientes com lesões de MF em fases iniciais e observaram epidermotropismo em 96% dos casos e os microabscessos de Pautrier em apenas 19%. No nosso grupo de estudo em micose fungoide (Yamashita, 2011), constatamos o microabscesso de Pautrier em 85% dos casos, demonstrando ser um critério de alta sensibilidade em nossa população, bem como o epidermotropismo desproporcional que demonstrou significância estatística, sendo observado em 70% dos pacientes com diagnóstico definitivo de MF.

Yamashita (2011), refere como critérios histológicos de alta especificidade para o diagnóstico de MF em fases clínicas iniciais o epidermotropismo desproporcional, atipias linfocitárias, tanto de tamanho das células epidérmicas em relação às dérmicas, quanto à irregularidade na carioteca, alinhamento de linfócitos e os microabscessos de Pautrier. Por outro lado, a hiperqueratose, hiperplasia epidérmica e fibrose da derme papilar foram interpretadas como sinais indiretos de cronicidade da lesão.

O estágio tumoral caracteriza-se por um infiltrado difuso e denso de linfócitos cerebriformes de médio a grande tamanho com perda do epidermotropismo. Há uma diminuição concomitante do número de linfócitos T reativos e das células dendríticas. Nessa fase pode ocorrer a transformação para linfoma T de grandes células CD30+ ou CD30- (Willemze & Dreyling, 2009, Elder et al., 2009).

Embora o linfoma anaplásico de grandes células CD30+ primário, tenha com frequência, uma boa evolução, os linfomas CD30+ secundários associados à MF apresentam um prognóstico reservado com sobrevida média de 11 a 36 meses (Keehn et al., 2007, Cerroni et al., 1992, Vergier et al, 2000).

2.8 Aspectos Imunoistoquímicos e Moleculares

As células tumorais da MF são caracterizadas como linfócitos T periféricos epidermotrópicos, cujo fenótipo é CD2⁺, CD3⁺, CD4⁺, CD5⁺, CD8⁻ CD20⁻ e CD30⁻. Raramente são observados casos CD4⁻ e CD8⁺ (Sampaio & Rivitti, 2007, Magro & Dyrsen, 2008).

A avaliação da proporção CD4/CD8 nos linfócitos T constitui um ponto de referência para ampliar a investigação diagnóstica, pois, embora tenha baixa sensibilidade, apresenta alta especificidade (Sampaio & Rivitti, 2007, Magro & Dyrsen, 2008).

A perda da expressão do CD7 pode ser observada mesmo nas fases iniciais da doença. No entanto, a negatividade para CD7 isolada, não é critério suficiente para o diagnóstico, podendo ser demonstrada em dermatoses inflamatórias (Glusac, 2001). Com raras exceções, tanto o Ki-67 quanto o CD 30, tendem a negatividade nas fases iniciais de MF (Magro & Dyrsen, 2008, Edinger et al., 2009).

O antígeno específico para o tropismo cutâneo de linfócitos (*cutaneous leucocyte-associated antigen receptor* – CLA), reconhecido pelo anticorpo HECA-452 é expresso na maioria dos casos de MF, em linfomas e discrasias de células T (Magro & Dyrsen, 2008).

O CLA é também expresso em vários tipos de dermatoses inflamatórias exceto no lupus eritematoso. A perda da expressão do CLA pode ser indicativa da progressão do linfoma T para uma fase mais agressiva, por exemplo, transformação para linfoma CD30⁺ (Sampaio & Rivitti, 2007, Magro & Dyrsen, 2008).

Os estudos imunoistoquímicos procuram demonstrar a perda de antígenos próprios das células T nos linfócitos da epiderme, embora esse achado isolado não seja específico. Por exemplo, a expressão diminuída ou perda de expressão de CD2 ou CD5 tem sido considerada de valor para o diagnóstico, porém, sua sensibilidade é baixa (Sampaio & Rivitti, 2007, Magro & Dyrsen, 2008).

A completa avaliação da expressão dos antígenos T pode fornecer informações que corroborem com o diagnóstico, mas ainda assim a sensibilidade continua baixa (Sampaio & Rivitti, 2007, Magro & Dyrsen, 2008). Por outro lado, o estudo da clonalidade, associado à imunoistoquímica oferece alta especificidade diagnóstica, especialmente quando há perda isolada da expressão do CD7 (Sampaio & Rivitti, 2007, Elder et al., 2009).

A perda de expressão das citocinas Th1 como INF- δ e IL-2, em comparação ao aumento nos níveis de IL-4, IL-5 e IL-10 que são citocinas Th2, nos pacientes com MF reflete a progressiva perda da capacidade imune dos mesmos e está diretamente relacionada à

gravidade da doença (Beyer et al., 2011). Essa é uma provável explicação para as alterações nos genes de expressão das citocinas durante a progressão da doença, na medida em que as células T malignas se proliferam e predominam durante a evolução clínica do estágio I ao IV.

O TCR é formado por duas cadeias peptídicas que durante a maturação dos linfócitos T recombina-se resultando em uma variabilidade de expressões de linfócitos T. Cerca de 95% dos linfócitos T circulantes são compostos por TCR formados pelas cadeias α e β , os demais são formados por cadeias γ , δ e suas recombinações.

O método diagnóstico de biologia molecular mais empregado na detecção de linfócitos T monoclonais é a análise do rearranjo gênico do TCR, que pode ser realizado através dos métodos de reação em cadeia da polimerase (PCR) ou Southern blot. Porém, alguns estudos demonstraram que apenas 53% dos casos de MF em fases iniciais apresentaram população de linfócitos T monoclonais (Boehncke et al., 1992, Bergman, 1992, Bachelez et al., 1995, Curcio et al., 1997, Ashton-Key et al., 1997, Bergman et al., 1998, Massone et al., 2005). Outro inconveniente é que várias dermatites também podem ter expansão monoclonal de células T (Keehn et al., 2007, Solomon & Magro, 2008)

As observações acima têm levado especialistas à discussão quanto às dificuldades diagnósticas das lesões iniciais de MF e proposto algoritmos que incluam a histopatologia, imunoistoquímica e técnicas de biologia molecular para melhorar a acurácia diagnóstica (Santucci et al., 2000, Guitart et al., 2001, Pimpinelli et al., 2005, Ferrara et al., 2008, Furmanczyk et al., 2010).

Guitart et al (2001) realizaram um estudo sobre a acurácia diagnóstica entre patologistas antes e após o treinamento dos critérios morfológicos principais para o diagnóstico de MF em fases iniciais a serem avaliados no pequeno, médio e grande aumento. Propondo um sistema de escores cujos diagnósticos finais variaram de dermatite perivascular ou interface, infiltrado linfoide atípico não excluindo MF, infiltrado linfoide atípico suspeito para MF e diagnóstico definitivo de MF. Demonstrando que é possível a melhora dessa acurácia diagnóstica, o que tem impacto na sobrevida dos pacientes caso seja feito um diagnóstico precoce.

REFERÊNCIAS*

ASADULLAH K.; DOCKE W.D.; HAEUSSLER A.; STERRY W.; VOLK H.D. Progression of mycosis fungoides is associated with increasing cutaneous expression of interleukin-10 mRNA. *J Invest Dermatol* 1996; 107(6): 833-7.

ASADULLAH K.; FRIEDRICH M.; DOCKE W.D.; JAHN S.; VOLK H.D.; STERRY W. Enhanced expression of T-cell activation and natural killer cell antigens indicates systemic anti-tumor response in early primary cutaneous T-cell lymphoma. *J Invest Dermatol* 1997; 108: 743-747.

ASHTON-KEY M.; DISS T.C.; DU M.Q. et al. The value of the polymerase chain reaction in the diagnosis of cutaneous T-cell infiltrates. *Am J Surg Pathol* 1997; 21: 743-747.

BACHELEZ H.; BIOUL L.; FLAGEUL B. et al. Detection of clonal T-cell receptor gamma gene rearrangements with the use of the polymerase chain reaction in cutaneous lesions of mycosis fungoides and Sezary syndrome. *Arch Dermatol* 1995; 131: 1027-1031.

BARBERIO E.; THOMAS L.; SKOWRON F.; BALM B.; DALLE S. Transformed mycosis fungoides: clinicopathological features and outcomes. *Br J Dermatol* 2007; 157: 284-289.

BAZIN P.A.E. *Maladies de la peau Observees a l'Hopital St Louis, Paris, France*, 1876.

BERGER C.L.; TIGELAAR R.; COHEN J.; MARIWALLA K.; TRINH J.; WANG N.; EDELSON R.L. Cutaneous T-cell lymphoma: malignant proliferation of T-regulatory cells. *Blood* 2005; 105(4): 1640-7.

BERGMAN R.; FACLIERU D.; SAHAR D. et al. Immunophenotyping and T-cell receptor gamma gene rearrangement analysis as an adjunct to the histopathologic diagnosis of mycosis fungoides. *J Am Acad Dermatol* 1998; 39: 554-559.

BERGMAN R. How useful are T-cell receptor gene rearrangement studies as an adjunct to the histopathologic diagnosis of mycosis fungoides? *Am J Dermatopathologic* 1992; 21: 498-502.

BEYER M.; MOBS M.; HUMME D.; STERRY W. Pathogenesis of Mycosis fungoides. *JDDG* 2011; 9: 1-5.

BINAZZI M. Some research on parapsoriasis and lymphoma. *Arch Dermatol Res* 1977; 258: 17-23.

BOEHNCKE W.H.; KRETTEK S.; PARWARESCH M.R. et al. Demonstration of clonal disease in early mycosis fungoides. *Am J Dermatopathol* 1992; 14: 95-99.

BOUAZIZ J.D.; ORTONNE N.; GIUSTINIANI J.; SCHIAVON V.; HUET D.; BAGOT M. et al. Circulating natural killer lymphocytes are potential cytotoxic effectors against autologous malignant cells in Sézary syndrome patients. *J Invest Dermatol* 2005; 125: 1273-1278.

BRENNER D.; KRAMER P.H.; ARNOLD R. Concepts of activated T cell death. *Crit Rev Oncol Hematol* 2008; 66(1): 52-64.

CARRERAS J.; LOPEZ-GUILLERMO A.; FOX B.C.; COLOMO L.; MARTINEZ A.; RONCADOR G. et al. High numbers of tumor infiltrating FOXP3 positive regulatory T cells are associated with improved overall survival in follicular lymphoma. *Blood* 2006; 108: 2957-2964.

CERRONI L.; KERL H.; KODAMA K.; MASSONE C. Histopathologic Features of early (Patch) lesions of mycosis fungoides. *Am J Surg Pathol* 2005; 29 (4): 550-559.

CERRONI L.; GATTER K.; KERL H. Mycosis fungoides. In: *Skin lymphoma. The illustrated guide*. Eds. Wiley-Blackwell. Oxford-UK. 3rd Ed. 2009. Chp.2, p.11-56.

CERRONI L.; RIEGER E.; HODL S. et al. Clinicopathologic and immunologic features associated with transformation of mycosis fungoides to large-cell lymphoma. *Am J Surg Pathol* 1992; 16: 543-552.

CRUCO N.; SERVITJE O.; LLUCIA M. et al. Genotypic analysis of cutaneous T-cell lymphoma: a comparative study of Southern blot analysis with polymerase chain reaction amplification of the T-cell receptor-gamma gene. *Br J Dermatol* 1997; 137: 673-679.

CUROTTO DE LAFAILLE M.A.; LAFAILLE J.J. Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells: more of the same or division of labor? *Immunity* 2009; 30: 626-635.

EDELSON R.L. Cutaneous T-cell lymphoma: mycosis fungoides, Sézary syndrome and other variants. *J Am Acad Dermatol* 1980; 2: 89-94.

EDINGER J.T.; CLARK B.Z.; PUCEVICH B.E.; GESKIN L.J.; SWERDLOW S.H. CD30 Expression and proliferative fraction in Nontransformed Mycosis Fungoides. *Am J Surg Pathol* 2009; 33: 1860-1868.

ELDER E.D.; ELENITSAS R.; MURPHY G.F. et al. *Lever's Histopathology of the skin*. 10th ed, Lippincott Williams & Wilkins, 2009; 936-944.

FERRARA G.; BLASI A.D.; ZALAUDEK I.; ARGENZIANO G.; CERRONI L. Regarding the algorithm for the diagnosis of early mycosis fungoides proposed by the International Society for Cutaneous Lymphomas: suggestions from routine histopathology practice. *J Cutan Pathol* 2008; 35: 549-553.

FRIED I.; CERRONI L. FOXP3 in sequential biopsies of progressive mycosis fungoides. *Am J Dermatopathol* 2012; 34: 263-265.

FURMANCZYK P.; WOLGAMOT G.M.; KUSSICK J.S.; SABATH D.E.; OLERUD J.E.; ARGENYI Z.B. Diagnosis of mycosis fungoides with different algorithmic approaches. *J Cutan Pathol* 2010; 37: 8-14.

GJERDRUM L.M.; WOETMANN A.; ODUM N.; BURTON C.M.; ROSSEN K.; SKOVGAARD G.L. et al. FOXP3+ regulatory T cells in cutaneous T-cell lymphomas: association with disease stage and survival. *Leukemia* 2007; 21(12): 2512-8.

GLUSAC E.J.: Of Cells and architecture: New approaches to old criteria in mycosis fungoides. *J Cutan Pathol* 2001; 28: 169-173.

GOTERI G.; FILOSA A.; MANELLO B.; STRAMAZZOTTI D.; RUPOLI S.; LEONI P. et al. Density of neoplastic lymphoid infiltrate, CD8+ T cells, and CD1a+ dendritic cells in mycosis fungoides. *J Clin Pathol* 2003; 56: 453-8.

GUIART J.; KENNEDY J.; RONAN S.; CHMIEL J.S.; HSIEGH Y.C.; VARIAKOJIS D. Histologic criteria for the diagnosis of mycosis fungoides: proposal for a grading system to standardize pathology reporting. *J Cutan Pathol* 2001; 28: 174-78.

HALLERMANN C.; NIERMANN C.; HANS-JOACHIM S. Regulatory T-cell phenotype in association with large cell transformation of mycosis fungoides. *Eur J Haematol* 2007; 78: 260-263.

INCA - INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Estimativas 2014. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014>. Acesso em 20 de março de 2015.

JAWED S.I.; MYSKOWSKI P.L.; HORWITZ S.; MOSKOWITZ A.; QUERFELD C. Primary cutaneous T-cell lymphoma (mycosis fungoides and Sézary syndrome) Part I. Diagnosis: Clinical and histopathologic features and new molecular and biologic markers. *J Am Acad Dermatol* 2014; 70(2): 205e1-205e16.

JENNI D.; KARPOVA M.B.; SEIFERT B. et al. Primary cutaneous lymphoma: two-decade comparison on a population of 263 cases from a Swiss tertiary referral centre. *Br J Dermatol* 2011; 164(5): 1071-7.

KEEHN C.A.; BELONGIE I.P.; SHISTIK G.; FENSKE N.A.; GLASS L.F. The diagnosis, staging and treatment options for mycosis fungoides. *Cancer Control* 2007; 14: 102-111.

LEI L.; ZHAN L.; TAN W.; CHEN S.; LI Y.; REYNOLDS M. Foxp3 gene expression in oral lichen planus: a clinicopathological study. *Mol Med Rep*. Mar 2014; 9(3): 928-34. doi: 10.3892/mmr.2014.1919. Epub 2014 Jan 14. PMID: 24469541.

LIU V.; BAUM C. Inflammatory Mimics of Mycosis Fungoides. *Pathology Case Reviews* 2011; 16(1): 45-51.

MAGRO C.M.; DYRSEN M.E. Cutaneous lymphocyte antigen expression in benign and neoplastic cutaneous B- and T- cell lymphoid infiltrates. *J Cutan Pathol* 2008; 35: 1040-1049.

MAGRO C.M.; MIHM M.C.; CROWSON A.N. Mycosis fungoides. In: *The Cutaneous Lymphoid Proliferations*. 2007. Eds. John Wiley & Sons, Inc. New Jersey. Chp.14. Pag. 267-299.

MASSONE C.; KODAMA K.; KERL H.; CERRONI L. Histopathologic Features of Early (Patch) Lesions of Mycosis Fungoides. *Am J Surg Pathol* 2005; 29: 550-560.

NASHAN D.; FAULHABER D.; STANDER S.; LUGER T.A.; STADLER R. Mycosis fungoides: a dermatological masquerader. *British Journal of Dermatology* 2007; 156: 1-10.

OLSEN E.; VONDERHEID E.; PIMPINELLI N. et al. Revisions to the staging and classification of mycosis fungoides and Sézary syndrome: a proposal of the International Society of Cutaneous Lymphoma (ISCL) and the cutaneous lymphoma task force of the European Organization of Research and Treatment of Cancer (EORTC). *Blood* 2007; 110: 1713-22.

PIMPINELLI N.; OLSEN E.A.; SANTUCCI M. et al. Defining early mycosis fungoides. *J Am Acad Dermatol* 2005; 53: 1053-1063.

RALFKIAER E.; CERRONI L.; SANDER C.A.; SMOLLER B.R.; WILLEMZE R. In: *WHO Classification of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. Swerdlow, Eds. WHO Press. Geneva Swz. 2008; Pg: 296-308.

RIZYL M.A.; EVENS M.S.T.; NELSON B.P.; ROSEN S.T. T-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 2008; 107: 1255-1284.

SAKAGUCHI S.; MIYARA M.; CONSTANTINO C.M.; HAFLER D.A. FOXP3 + regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol* 2010; 10: 490-500.

SAKAGUCHI S.; SAKAGUSHI N.; ASANO M.; ITOH M.; TODA M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 1995; 155: 1151-1164.

SAMAPIO S.A.P.; RIVITTI E.A. Leucemias, linfomas e pseudolinfomas. In: *Dermatologia*. Eds. Artes Médicas. São Paulo. 3º Ed. 2007. p. 1247-1272.

SANCHEZ J.L.; ACKERMAN A.B. The patch stage of mycosis fungoides: criteria for histologic diagnosis. *Am J Dermatopathol* 1979; 1:5-26.

SANTUCCI M.; BIGGERI A.; FELLER A.C.; BURG G. Accuracy, concordance, and reproducibility of histologic diagnosis in cutaneous T-cell lymphoma. *Arch Dermatol* 2000; 136: 497-502.

SMOLLER B.R. Mycosis fungoides: what do/do not we know? *J Cutan Pathol* 2008; 35(suppl.2): 35-39.

SOLOMON G.J.; MAGRO C.M. Foxp3 expression in cutaneous T-cell lymphocytic infiltrates. *J Cutan Pathol* Nov; 2008; 35(11): 1032-9. [Pubmed: 18681861]

STEFFEN C. Ketrin-Goodman disease, Woringer-Kolopp disease and pagetoid reticulosis. *Am J Dermatopathol* 2005; 27: 68-85.

STREINMAN R.M. Dendritic cells: understanding immunogenicity. *Eur J Immunol* 2007; 37(Suppl 1): S53-60.

STUTMAN O. Intrathymic and extrathymic T cell maturation. *Immunol Rev* 1978; 42: 138-84.

TIEMESSEN M.M.; MITCHELL T.J.; HENDRY L.; WHITTAKER J.J.; TAAMS L.S.; JOHN S. Lack of suppressive CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ in advanced stages of primary cutaneous Tcell lymphoma. *J Invest Dermatol* 2006; 126: 2217-2223

TORRES-CABALA C.A.; CURRY J.L.; LI NING TAPIA E.M.; RAMOS C.; TETZLAFF M.T.; PRIETO V.G.; MIRANDA R.N.; BRAVO F. T-regulatory lymphocytes. *J Dermatol Sci. Mar* 2015; 77(3): 150-5. doi:10.1016/j.jdermsci.2015.01.003. Epub 2015 Jan 23. PMID: 25676425.

VAN DOORN R.; VAN KESTER M.S.; DIJKMAN R.; VERMEER M.H.; MULDER A.A.; SZUHAI K. et al. Oncogenomic analysis of mycosis fungoides reveals major differences with Sézary syndrome. *Blood* 2009; 113: 127-136.

VERGIER B.; MURET A.; BEYLOT-BARRY M. et al. Transformation of mycosis fungoides: clinicopathological features and prognostic features of 45 cases. French Study Group of Cutaneous Lymphomas. *Blood* 2000; 95: 2212-2218.

VERMEER M.H.; VAN DOORN R.; DUKERS D.; BEKKENK M.W.; MEIJER C.J.; WILLEMZE R. CD8⁺ T cells in cutaneous T-cell lymphoma: expression of cytotoxic proteins, Fas ligand, and killing inhibitory receptors and their relationship with clinical behavior. *J Clin Oncol* 2001; 19: 4322-4329.

WADA D.A.; WILCOX R.A.; WEENIG R.H.; GIBSON L.E. Paucity of intraepidermal FOXP3-positive T cells in cutaneous T-cell lymphoma in contrast with spongiotic and lichenoid dermatitis. *J Cutan Pathol* 2010; 37: 535-541.

WEINSTOCK M.A.; GARDSTEIN B. Twenty-year trends in the reported incidence of mycosis fungoides and associated mortality. *Am J Public Health* 1999; 89: 1240-1244.

WILLEMZE R.; DREYLING M. Primary cutaneous lymphoma: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2009; 20(suppl. 4): 115-118.

WILLEMZE R.; JAFFE E.L.; BURG G. et al. WHO-EORTC classification for cutaneous lymphomas. *Blood* 2005; 105: 3768-85.

WILLEMZE R.; MEIJER C.J.L.M. Classification of cutaneous T-cell lymphoma: from Alibert to WHO-EORTC. *J Cutan Pathol* 2006; 33(suppl.1): 18-26.

WYSOCKA M.; BENOIT B.M.; NEWTON S.; AZZONI L.; MONTANER L.J.; ROOK A.H. Enhancement of the host immune responses in cutaneous T-cell lymphoma by CpG oligodeoxynucleotides and IL-15. *Blood* 2004; 104: 4142-4149.

ZOI-TOLI O.; VERMMER M.H.; DE VRIES E.; VAN BEEK P.; MEIJER C.J.; WILLEMZE R. Expression of Fas and Fas-ligand in primary cutaneous T-cell lymphoma (CTCL): association between lack of Fas expression and aggressive types of CTCL. *Br J Dermatol* 2000; 143(2): 313-9.

ZOU W. Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nat Rev Immunol* Apr 2006; 6(4): 295-307.

YAMASHITA, Thamy. Micose fungoide: diagnóstico nas fases iniciais através da correlação clínico-morfológica e imunoistoquímica das lesões. 2011. 66 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu, 2011. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/95882>>. Acesso em 05 de junho de 2015.

* Referências elaboradas de acordo com as normas da ABNT.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Foram estudadas as biópsias de casos com diagnóstico confirmado de MF clássica nas fases clínicas iniciais (máculas e placas), psoríase vulgar, dermatite eczematosa e líquen plano do serviço de Dermatologia e de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu – Universidade Estadual Paulista (UNESP) observados no período de 1999 a 2014.

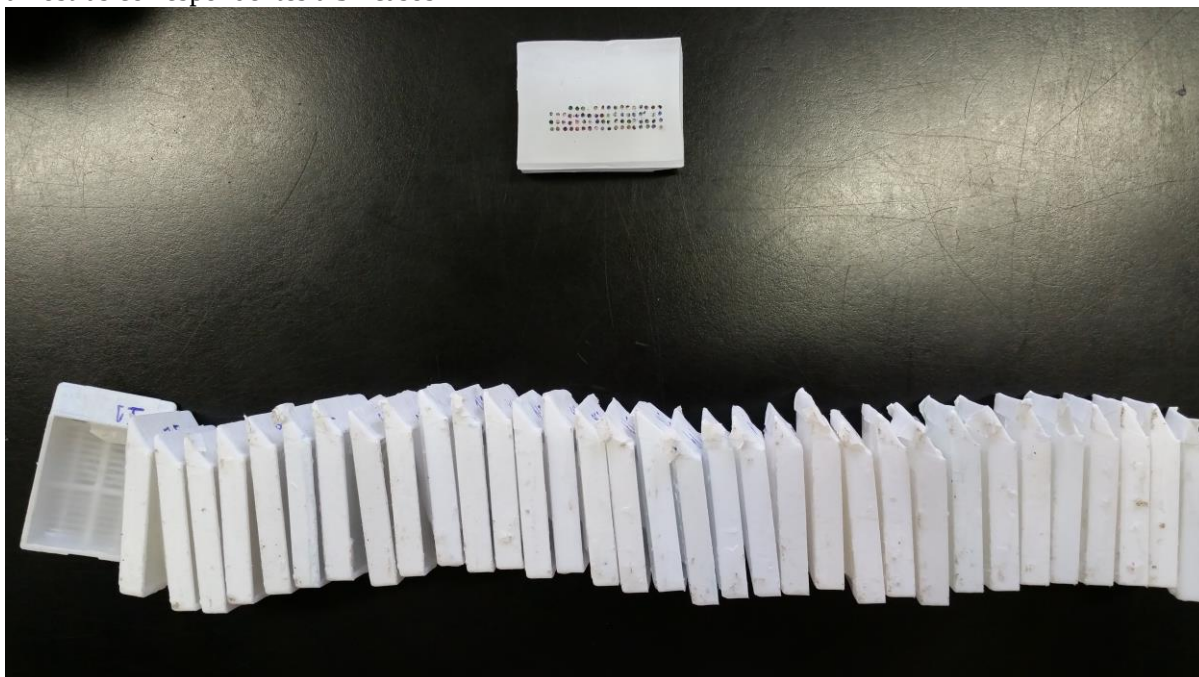
Os casos confirmados de MF no período de 1999 a 2014, foram reavaliados com revisão das lâminas coradas pela hematoxilina & eosina (HE) por dois patologistas gerais e um dermatologista com experiência em dermatopatologia. Esses casos foram designados de grupo 1. Cortes histológicos dos casos com diagnósticos firmados foram imunomarcados pelo FOXP3.

Os casos de dermatoses inflamatórias constantes do arquivo do Serviço de Patologia e com diagnóstico firmado como: psoríase, eczema e líquen plano foram designados como grupo 2 e tiveram igualmente suas lâminas revisadas pelos mesmos patologistas gerais e um dermatologista com experiência em dermatopatologia. Cortes histológicos dos casos com diagnósticos firmados foram imunomarcados.

Imunomarcação: Utilizou-se o marcador monoclonal anti-FOXP3 clone 236A/E7 em todos os casos confirmados de MF e nos casos previamente selecionados dos principais diagnósticos diferenciais. No grupo 1 foi realizado os marcadores para linfócitos T – CD3, CD4 e CD8, para linfócitos B – CD20, e o CD30 (Anexo 1). No grupo 2 realizou-se os marcadores CD3, CD4, CD8 e CD20 utilizando-se a técnica de arranjo em matriz de amostras teciduais (TMA) (Anexo 2).

O TMA trata-se da construção de um bloco de parafina contendo fragmentos cilíndricos de amostras teciduais de interesse obtidos a partir de dezenas ou centenas de blocos de parafina originais (Andrade et al, 2007). Foi construído um bloco receptor contendo duas amostras de 1,0mm cada, referentes a cada bloco original, obtivemos ao final do processo um bloco contendo 68 amostras (Figura 1).

Figura 1 - Técnica de arranjo em matriz de amostras teciduais (TMA): bloco receptor contendo 68 amostras correspondentes a 34 casos



Fonte: o autor

O marcador imunoistoquímico FOXP3 foi graduado quanto a proporção de células que foram imunomarcadas de cada caso: escore 0 = 0 a 5% de positividade, escore 1+= positivo em >5 a 25%, escore 2+ = positivo em >25 a 50%, escore 3+= positivo em > 50 a 75% e escore 4+ = >75% de positividade. A imunomarcação das células da epiderme foi contada em separado da imunomarcação das células da derme. Após a comparação entre os graus de positividade entre os grupos 1 e 2 realizou-se estudo estatístico.

Para melhor avaliação estatística após a análise individualizada de um caso por paciente das doenças de interesse, os grupos 1 e 2 foram organizados de acordo com os escores de imunoistoquímica 0 a 2+ e de 3 a 4+.

Tamanho da amostra: A amostragem alvo da pesquisa é composta por lâminas de pacientes diagnosticados comprovadamente como portadores de MF no período de 1999 e 2014. A amostragem comparativa é constituída por lâminas de casos comprovados de psoríase, eczema e líquen plano que constem no arquivo de lâminas do Serviço de Patologia e diagnosticados no mesmo período acima citado.

Não existem estudos brasileiros que definam claramente a prevalência das condições acima em nosso país. Para o cálculo da amostra, assumindo que foram aplicados testes bicaudais para a diferença de médias entre amostras independentes, assumido um erro padrão

de 20% ($1 - \beta$ = poder de 80%), com um α de 5% (IC 95%), e uma prevalência estimada de 1%, a amostra foi de 30 pacientes no grupo 1 e de 34 no grupo 2.

A amostragem é constituída de cortes histológicos de casos previamente diagnosticados e arquivados no Departamento de Patologia, e cujo reestudo não implicará em mudanças no acompanhamento a que os mesmos estão sendo submetidos na rotina.

6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi feita análise descritiva dos dados e Teste de Qui-quadrado ou de Fisher a depender da necessidade para estudar a associação entre os critérios de coloração do imunomarcador FOXP3 e os diagnósticos do grupo de casos e do grupo controle. Dentro do grupo de casos foi avaliado a associação da expressão do imunomarcador FOXP3 com MF na fase tumoral. Os resultados foram considerados estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

Todos os cálculos foram analisados no programa IBM SPSS, versão 20.

7 RESULTADOS

REFERENTE À COLETA DE DADOS

Foram estudadas 77 biópsias no total, que correspondiam a 64 pacientes seguidos no Serviço de Dermatologia da FMB e que deram entrada no Serviço de Patologia da FMB com diagnósticos clínicos e anatomopatológicos definidos em MF, psoríase vulgar, dermatite eczematose e líquen plano.

Foi realizada a avaliação histológica e imunoistoquímica dessas biópsias, com base nos parâmetros previamente definidos para o estudo.

DESCRIÇÃO DA AMOSTRA DO GRUPO 1 - CASOS

Foram selecionados 43 biópsias cujo diagnóstico anatomopatológico final foi de MF, correspondendo a 30 pacientes (Figura 2), sendo que 13 deles foram rebiópsiados de uma a cinco vezes durante o período analisado, o que corresponde a uma mediana de três biópsias realizadas por paciente e a média de 3,2 (Tabela 1).

Figura 2 - 1)Mácula eritemato-descamativa de limites imprecisos, formato irregular localizada no tronco. 2)Mácula eritemato-hipocrômica com superfície de aspecto atrófico, de limites nítidos e mácula de menor diâmetro, eritemato-acastanhadas também de aspecto atrófico, localizadas no dorso. 3)Mácula de grande diâmetro, eritemato-violácea discretamente descamativa, de grande diâmetro, localizada no flanco. 4)Mácula hipocrômica e atrófica com descamação superficial localizada no tórax.



Fonte: o autor

Tabela 1 - Número de biópsias realizadas para o diagnóstico de certeza de micose fungoide

Nº biópsias realizadas	Sequência de biópsias	
	Nº casos	%
1	8	18,6
2	7	32,6
3	4	27,9
4	1	9,3
5	1	11,6
Total	43	100,0

Fonte: o autor (2015).

A idade média dos pacientes do grupo 1 foi de 55 anos, sendo a idade mínima de 18 anos e a máxima de 84 anos.

DESCRIÇÃO DA AMOSTRA DO GRUPO 2 - CONTROLES

Foram selecionados 34 biópsias cujos diagnósticos anatomopatológicos finais foram psoríase, dermatite subaguda espongíótica e líquen plano. A população ficou subdividida da seguinte forma: 12 casos de psoríase, 12 de dermatite subaguda espongíótica e 10 de líquen plano.

A idade média dos pacientes com diagnóstico de psoríase foi de 46 anos, sendo a idade mínima de 8 anos e a máxima de 76 anos. A idade média dos pacientes com diagnóstico de dermatite subaguda espongíótica foi de 42 anos, sendo a idade mínima de 17 anos e a máxima de 76 anos. A idade média dos pacientes com diagnóstico de líquen plano foi de 40 anos, sendo a idade mínima de 22 anos e a máxima de 56 anos.

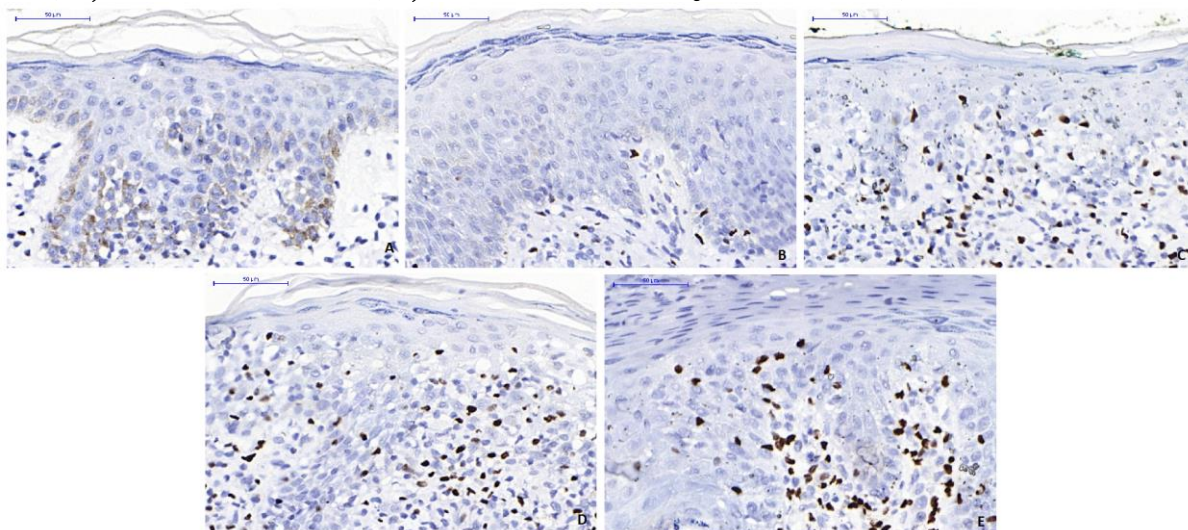
ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICOS DOS GRUPOS 1 E 2

Ao analisar os achados imunoistoquímicos realizados no grupo 1, verificou-se que em todos os casos houve uma positividade predominante do CD3 tanto epidérmico quanto dérmico, principalmente nas células com positividade para o CD4, em detrimento da mínima ou ausente expressão do marcador de linfócito B, CD20, o que comprova a presença de células T com tropismo para epiderme.

No grupo 2, houve predomínio da positividade do CD3 sobre o CD20 tanto epidérmico quanto dérmico. A população de linfócitos T CD4+ e CD8+ foi praticamente a mesma.

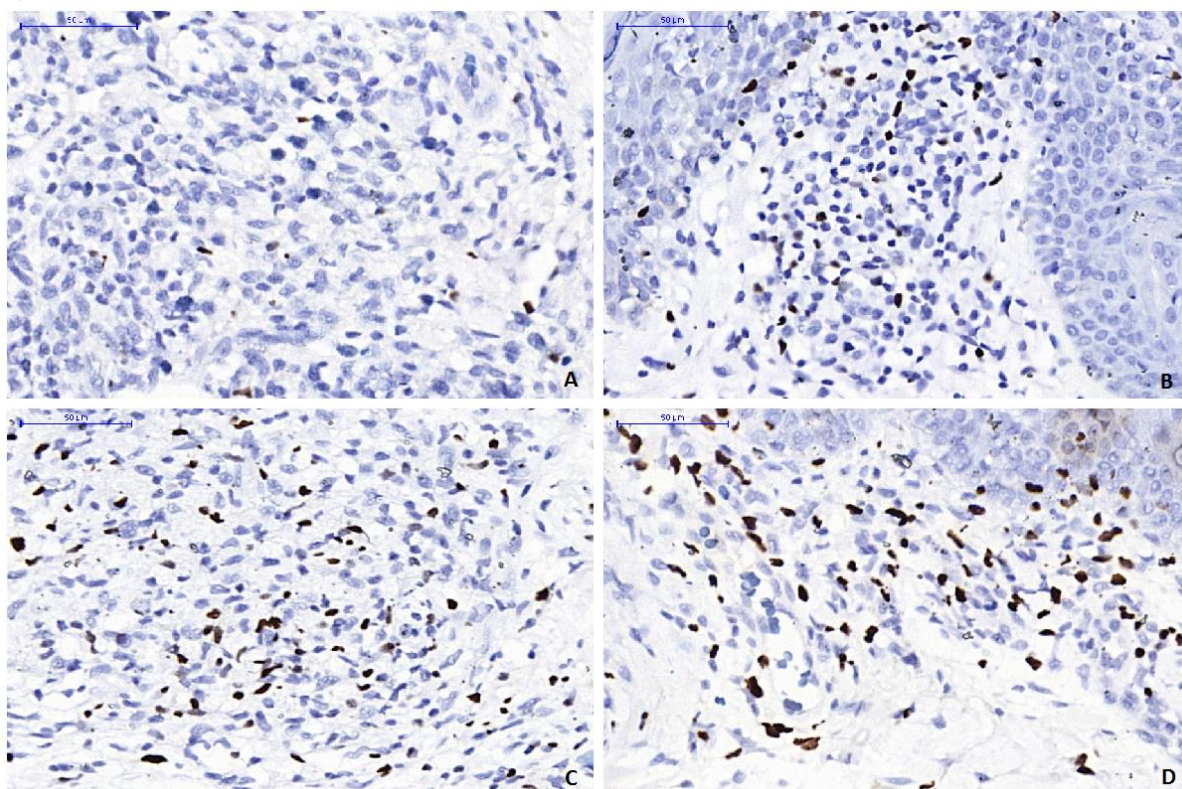
O escore para o imunomarcador FOXP3 foi graduado quanto a proporção de células T CD4+ que foram imunomarcadas de cada caso da seguinte maneira escore 0 = 0 a 5% de positividade, escore 1+ = positivo em mais que 5 a 25%, escore 2+ = positivo acima de 25 a 50%, escore 3+ = positivo em mais que 50 a 75% e escore 4+ = acima de 75% de positividade (Figura 3 e Figura 4).

Figura 3 - Sistema de escores para positividade da expressão do FOXP3 nos linfócitos intraepiteliais nos casos de micose fungoide; A)Escore 0 = 0 a 5%; B)escore 1+ = >5 a 25%; C)Escore 2+ = >25 a 50%; D)Escore 3+= > 50 a 75%; E)Escore 4+ = >75%.IHQ, técnica da ABC, 400X



Fonte: o autor

Figura 4 - Sistema de escores para positividade da expressão do FOXP3 nos linfócitos dérmicos nos casos de micose fungoide; A)Escore 0 = 0 a 5%; B)Escore 1+ = >5 a 25%; C)Escore 2+ = >25 a 50%; D)Escore 3+= > 50 a 75%. IHQ, técnica da ABC, 400X



Fonte: o autor

Foi selecionada para a avaliação imunoistoquímica uma biópsia por paciente com os diagnósticos de MF, dermatite subaguda espongiforme, psoríase e líquen plano. Inicialmente a análise estatística resultou significativa quanto as diferenças de escore da positividade do

FOXP3 entre o grupo 1 e o grupo 2, tanto na epiderme ($p<0,001$) quanto na derme ($p=0,007$), porém ainda sem distinção entre quais entidades estava essa diferença estatística (Tabela 2). O escore médio no grupo 1 foi de 1,23 e no grupo 2 foi de 2,41 na epiderme e o escore médio do FOXP3 na derme foi de 0,83 no grupo 1 e de 1,15 no grupo 2 (Tabela 3).

Tabela 2 - Escore de FOXP3 segundo casos e por dermatose inflamatória

		Epiderme escore FOXP3		Derme escore FOXP3	
		Nºcasos	%	Nºcasos	%
MF	0	11	36.7	12	40.0
	1+	7	23.3	13	43.3
	2+	9	30.0	3	10.0
	3+	0	0.0	2	6.7
	4+	3	10.0	0	0.0
	Total	30	100.0	30	100.0
DSE	0	0	0.0	3	25.0
	1+	5	41.7	6	50.0
	2+	3	25.0	3	25.0
	3+	2	16.7	0	0.0
	4+	2	16.7	0	0.0
	Total	12	100.0	12	100.0
LP	0	0	0.0	0	0.0
	1+	0	0.0	3	30.0
	2+	1	10.0	3	30.0
	3+	1	10.0	4	40.0
	4+	8	80.0	0	0.0
	Total	10	100.0	10	100.0
P	0	5	41.7	6	50.0
	1+	1	8.3	6	50.0
	2+	2	16.7	0	0.0
	3+	1	8.3	0	0.0
	4+	3	25.0	0	0.0
	Total	12	100.0	12	100.0
Pearson Chi-Square		0.000		0.007	

Utilizando classificação agrupada

Legenda: MF= micose fungoide, DSE= dermatite subaguda espongiforme, LP= líquen plano e P= psoríase. Escore 0 = 0 a 5%, escore 1+ = >5 a 25%, escore 2+ = >25 a 50%, escore 3+ = >50 a 75% e escore 4+ = >75%

Fonte: o autor (2015).

Tabela 3 - Escores do FOXP3 separadas em casos e controles

Diagnóstico		Epiderme escore FOXP3	Derme escore FOXP3
MF	Contagem	30	30
	Média	1.23	0.83
	Desvio Padrão	1.251	0.874
	Mínimo	0	0
	Mediana	1	1
	Máximo	4	3
Controle	Contagem	34	34
	Média	2.41	1.15
	Desvio Padrão	1.520	0.958
	Mínimo	0	0
	Mediana	2.5	1
	Máximo	4	3

Legenda: MF = micose fungoide, Controles = dermatite subaguda espongiforme, líquen plano e psoríase. O N°casos correspondente a coluna idade remete a quantidade de pacientes com diferentes idades e nas demais colunas a quantidade total de casos.

Fonte: o autor (2015).

Para a adequação da análise estatística os escores foram reagrupados nos intervalos de 0 a 2+ e de 3 a 4+, ou seja, a positividade do FOXP3 em até 50% dos linfócitos T analisados e aqueles que foram positivos em mais de 50% desses linfócitos.

Dos 30 pacientes que compõem o grupo 1, 27 (90%) tiveram escore epidérmico de 0 a 2+ e 28 (93,3%) escore dérmico entre 0 a 2+. No grupo 2, os resultados obtidos nos pacientes com dermatite subaguda espongiforme foram semelhantes aos pacientes com psoríase, sendo que 66,7% apresentaram escore epidérmico de 0 a 2+ e todos os pacientes com dermatite subaguda espongiforme e psoríase apresentaram o escore de 0 a 2+ na derme (Tabela 4).

Tabela 4 - Escore agrupado por intensidade de imunomarcção FOXP3 segundo casos e dermatoses inflamatórias

		Epiderme escore ¹		Derme escore ¹	
		Nºcasos	%	Nºcasos	%
MF	0 até 2+	27	90.0	28	93.3
	3 e 4+	3	10.0	2	6.7
	Total	30	100.0	30	100.0
DSE	0 até 2+	8	66.7	12	100.0
	3 e 4+	4	33.3	0	0.0
	Total	12	100.0	0	0.0
LP	0 até 2+	1	10.0	6	60.0
	3 e 4+	9	90.0	4	40.0
	Total	10	100.0	10	100.0
P	0 até 2+	8	66.7	12	100.0
	3 e 4+	4	33.3	0	0.0
	Total	12	100.0	0	0.0
Pearson Chi-Square		0.000		0.004	
Utilizando classificação agrupada					

Legenda: MF= micose fungoide, DSE= dermatite subaguda espongiforme, LP= líquen plano e P= psoríase. Positividade do FOXP3 epidérmico e dérmico. Escore 0 até 2+ = 0 a 50%, escore 3 e 4+ = >50% e >75%.

Fonte: o autor (2015).

Porém apenas 1 (10%) dos pacientes com líquen plano tiveram o escore do FOXP3+ de 0 a 2+ na epiderme e 9 (90%) tiveram escore de 3 a 4+. Na derme esses pacientes apresentaram escore 0 a 2+ em 6 (60%) biópsias e escore 3 a 4+ em 4 (40%) das biópsias avaliadas (Tabela 4).

Após o agrupamento de todas as dermatoses no grupo 2, composta por 34 amostras, obtivemos os seguintes resultados comparativos de escore epidérmico do FOXP3 de 0 a 2+ em 17 (50%) biópsias e 17 (50%) com escore 3 a 4+. O escore epidérmico foi mais heterogêneo entre o grupo das dermatoses, sendo que 33,3% dos casos de dermatite subaguda espongiforme e psoríase tiveram um escore de 3 a 4+.

No escore dérmico 30 (88,2%) biópsias do grupo controle foi classificada de 0 a 2+ e 4 (11,8%) tiveram escore 3 ou 4+, ressaltando que essas 4 (11,8%) biópsias que foram FOXP3+ em mais de 50% das células T dérmicas eram de líquen plano (Tabela 5).

Tabela 5 - Escore agrupado por intensidade de imunomarcção FOXP3 segundo casos e controles

		Epiderme escore ¹		Derme escore ¹	
		Nºcasos	%	Nºcasos	%
MF	0 até 2+	27	90.0	28	93.3
	3 e 4+	3	10.0	2	6.7
	Total	30	100.0	30	100.0
Controle	0 até 2+	17	50.0	30	88.2
	3 e 4+	17	50.0	4	11.8
	Total	34	100.0	34	100.0
Pearson Chi-Square		0.000		Fisher's Exact Test	
Utilizando classificação agrupada				0.674	

Legenda: MF= micose fungoide, Controles= dermatite subaguda espongiforme, líquen plano e psoríase. Positividade do FOXP3 epidérmico e dérmico. Escore 0 até 2+ = 0 a 50%, escore 3 e 4+ = >50% e >75%.

Fonte: o autor (2015).

Dessa forma após a análise reagrupada do grupo 1 em relação ao grupo 2 apenas o escore epidérmico do FOXP3 foi estatisticamente significativo, no qual a positividade do FOXP3 foi menor no grupo 1 que no grupo 2 ($p < 0,001$) (Tabela 5).

Dentre os pacientes do grupo 1, cinco casos (16%) evoluíram para fase de MF forma tumoral, sendo dois casos CD30+ após 5 e 9 anos do início do surgimento das lesões cutâneas, dois casos CD30- após evolução de 1 e 2 anos e um caso teve transformação para

linfoma de grandes células CD30+ após 10 anos do aparecimento das placas eritêmato-descamativas.

O estudo da imunomarcção do FOXP3 nos casos da fase tumoral de MF resultou na epiderme nos escores de 0 a 2+ em 3 (60%) biópsias e, 3 e 4+ em 2 (40%), e na derme 5 (100%) resultaram no escore de 0 a 2+. Os resultados não foram estatisticamente significantes quando comparada aos casos de MF em fase clínica inicial, provavelmente devido a escassez de casos de MF na fase tumoral (Tabela 6).

Tabela 6 - Escore do FOXP3 nos casos de micose fungoide em fase clínica inicial e em fase tumoral segundo grupos de escore

Fase tumoral*		Epiderme escore ¹		Derme escore ¹	
		Nº casos	%	Nº casos	%
Não	0 até 2+	23	92.0	23	92.0
	3 e 4+	2	8.0	2	8.0
	Total	25	100.0	25	100.0
Sim	0 até 2+	3	60.0	5	100.0
	3 e 4+	2	40.0	0	0.0
	Total	5	100.0	5	100.0
Fisher's Exact Test		0.119		Fisher's Exact Test	
				1	

*Cada paciente teve uma única amostra incluída na análise, sendo preferida a amostra de fase tumoral e a primeira biópsia com diagnóstico de micose fungoide. Utilizando classificação agrupada

Legenda: Positividade do FOXP3 epidérmico e dérmico. Escore 0 até 2+ = 0 a 50%, escore 3 e 4+ = >50% e >75%.

Fonte: o autor (2015).

8 DISCUSSÃO

A seleção dos casos foi feita de forma retrospectiva dos pacientes acompanhados nos ambulatorios de dermatologia, o que submete o pesquisador à variabilidade na quantidade e qualidade dos informes, pois diferentes médicos são os que avaliam os pacientes durante o período considerado para o estudo; por vezes há ausência de informação se as biópsias foram realizadas na vigência de tratamento ou após período de interrupção dos tratamentos tópicos ou sistêmicos em uso ou a perda de seguimento de pacientes.

Como o material coletado para o estudo eram dos blocos de biópsias arquivadas no departamento de patologia, utilizou-se a primeira biópsia com o diagnóstico definitivo ou a mais representativa para a realização das reações de imunoistoquímica. A maior parte das biópsias foram incisionais, isto é, na forma de “punch” de 0,3 a 0,5cm uma vez que eram para confirmar ou elucidar o diagnóstico clínico.

Nas biópsias coletadas do grupo 2 realizou-se a técnica de TMA para os marcadores de linfócitos T e B, que não são utilizados na rotina para o diagnóstico das dermatoses, o que foi de grande valia para a otimização dos custos e tempo de análise dessas amostras. Tivemos uma perda que variou de 15 a 30% do material, que pode ser explicada pela pouca prática técnica na construção do bloco ou na realização dos cortes do bloco de parafina, uma vez que é uma técnica pouco utilizada pelo nosso laboratório e requer certa experiência para a realização do mesmo. Porém, há uma perda de material para análise intrínseca ao método, sendo considerado como bom uma perda até 20% dos fragmentos (Hoos et al, 2001).

A população selecionada para os grupos 1 e 2 foram escolhidos dentro de um mesmo público alvo dentre os pacientes que são atendidos no ambulatório de dermatologia. As médias de idades variaram de 40 a 55 anos de idade permitindo um melhor pareamento para comparação das características histopatológicas da pele.

A quantidade de linfócitos T epidermotrópicos foram diferentes nos grupos 1 e 2, porém a quantificação dos escores de FOXP3 baseou-se na contagem proporcional à população de linfócitos T CD4+ de cada biópsia.

O período analisado foi de 15 anos, o que possibilitou visualizarmos a evolução de alguns casos de MF que deram entrada na fase clínica inicial e no decorrer de um a 9 anos de acompanhamento houve a transformação de 4 (13,3%) casos para MF em fase tumoral e um caso evoluiu após 10 anos para linfoma de grandes células.

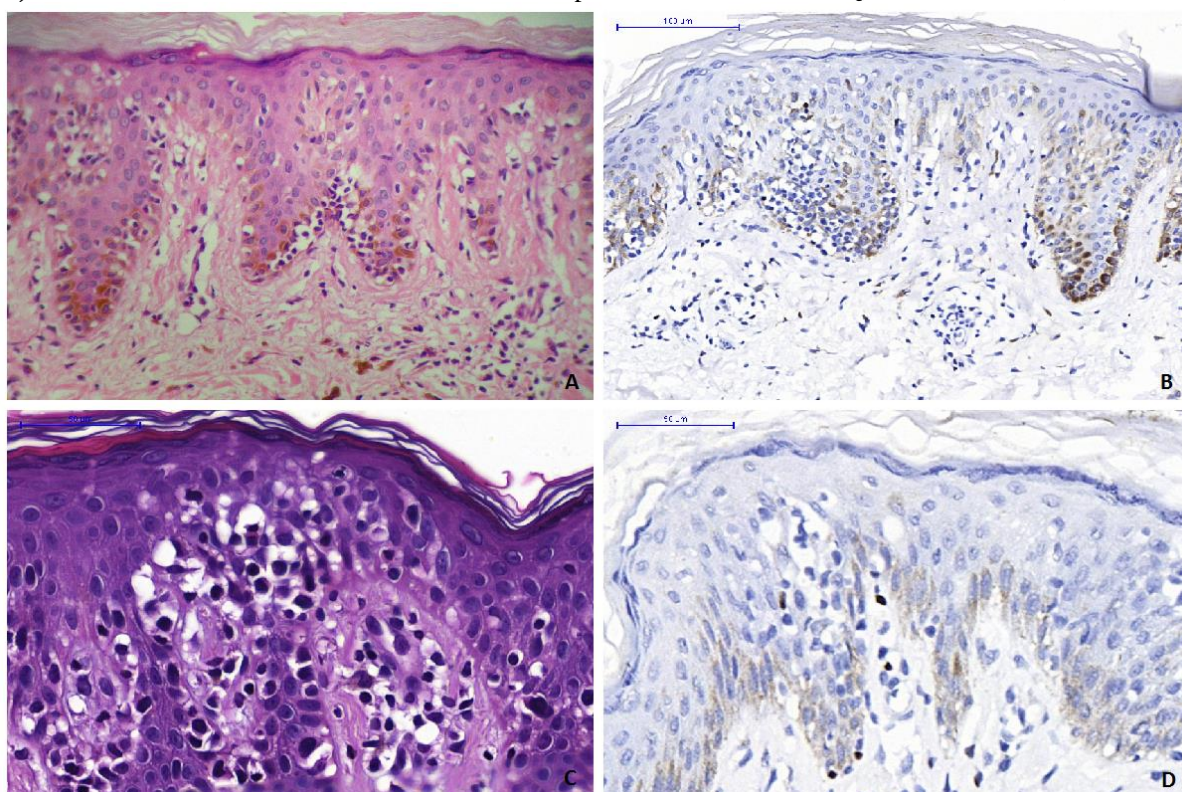
A clínica e a histologia podem ser inespecíficas nas lesões iniciais de MF e, em média, levam de quatro a seis anos de evolução, sem que o diagnóstico de certeza possa ser estabelecido (Reddy & Bhawan, 2007). Dos 30 pacientes estudados, 13 (43,3%) foram rebiopsiados de uma a cinco vezes até que o diagnóstico definitivo fosse firmado. O que confirma a importância do acompanhamento clínico e a necessidade diversas vezes da realização de múltiplas biópsias para que se tenha um diagnóstico mais preciso.

Conforme Fujimura et al., (2008) constatamos que as células da epiderme contêm uma porcentagem maior de FOXP3+ do que a derme. Porém nossos resultados diferiram quando consideramos a quantidade de FOXP3+ no infiltrado epidérmico e dérmico de cada uma das patologias analisadas.

Uma possível explicação para essa diferença, que também foi aventada por outro grupo de estudo (Wada et al., 2010) foi a escolha do anticorpo FOXP3. Utilizamos o marcador monoclonal anti-FOXP3 clone 236A/E7 de camundongo como os estudos de Solomon & Magro (2008) e Wada et al., (2010), enquanto que Fujimura et al., (2008) utilizaram o anticorpo anti-FOXP3 de coelho, cujo clone não foi especificado.

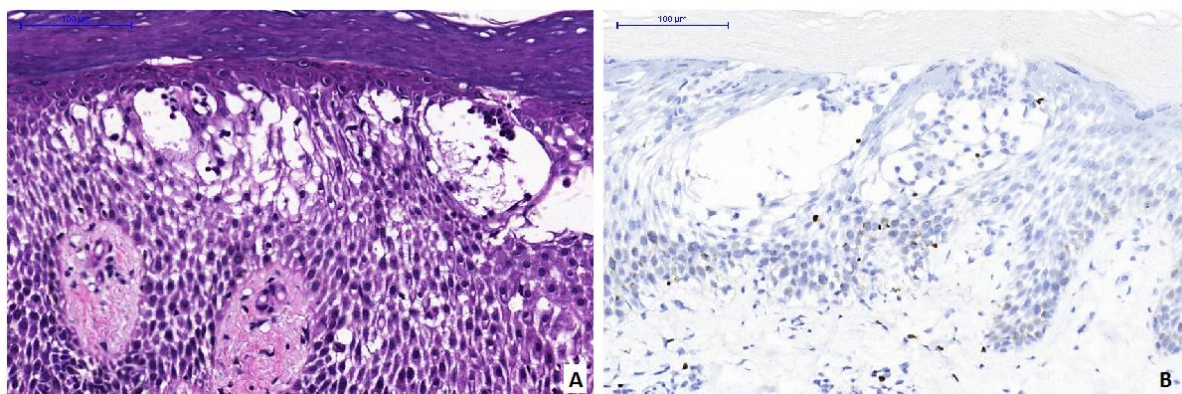
Os parâmetros dos pacientes que compõem o grupo 1 apresentaram em 90% dos casos positividade do FOXP3 entre 0 a 50% do infiltrado linfocitário epidermotrópico (Figura 5). No grupo 2, os resultados obtidos nos pacientes com DSE e psoríase, demonstraram essa positividade em 66,7% dos casos (Figura 6 e Figura 7).

Figura 5 - Micose fungoide; A)Epidermotropismo com linfócitos alinhados na porção basal. HE, 100X; B)Epidermotropismo com linfócitos alinhados na porção basal com ausência de expressão do FOXP3. IHQ, técnica da ABC, 100X; C)Microabscesso de Pautrier na epiderme. HE, 400X; D)Microabscesso de Pautrier com ausência de expressão do FOXP3. IHQ, técnica da ABC, 400X



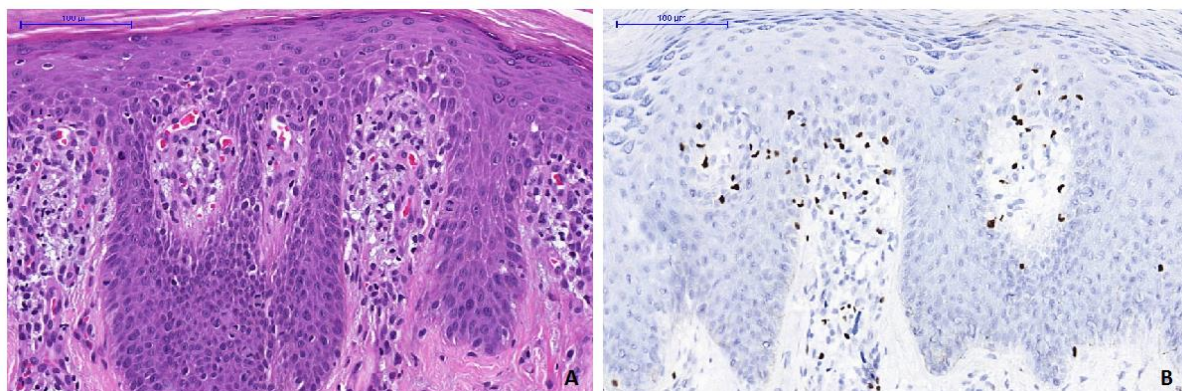
Fonte: o autor

Figura 6 – A)Dermatite subaguda espongíotica com vesículas e células inflamatórias. HE, 200X; B)Dermatite subaguda espongíotica e ausência de marcação para o FOXP3 (escore 0). IHQ, técnica da ABC, 200X



Fonte: o autor

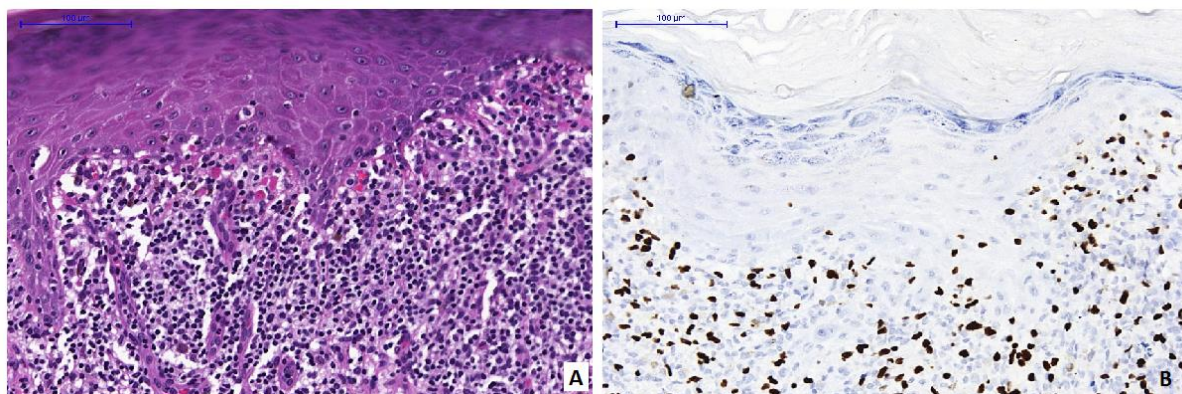
Figura 7 – A)Psoríase vulgar: infiltrado linfohistiocitário em derme papilar com exocitose de células inflamatórias para a epiderme. HE, 200X; B)Psoríase vulgar com expressão do FOXP3 em linfócitos intraepidérmicos (escore 3) e em derme papilar (escore 1). IHQ, técnica da ABC, 200X



Fonte: o autor

Porém apenas 10% dos pacientes com LP tiveram FOXP3+ na epiderme com escore de 0 a 50% das células, e 90% tiveram positividade para o FOXP3 em mais de 50% do infiltrado linfocitário intraepidérmico (Figura 8). Fato esse interessante, uma vez que o LP faz parte do grupo controle como dermatose inflamatória, sendo possível diagnóstico diferencial para a MF em fase clínica inicial e tenha se comportado de maneira distinta das outras dermatoses do grupo 2.

Figura 8 – A)Líquen plano com infiltrado linfohistiocitário liquenoide. HE, 200X; B)Líquen plano com intensa expressão do FOXP3 em linfócitos da porção basal da epiderme (escore 4) e derme papilar (escore 3). IHQ, técnica da ABC, 200X



Fonte: o autor

Relativo a porcentagem do FOXP3+ na derme observamos um predomínio do escore de 0 a 25% em todos os grupos.

Por conseguinte, após a análise conjunta do grupo 1 em relação ao grupo 2 apenas o escore epidérmico do FOXP3 foi estatisticamente significativo ($p < 0,001$), no qual o infiltrado intraepidérmico de FOXP3+ foi menor no grupo 1 de MF que o encontrado no grupo 2 das

dermatoses inflamatórias, concordando com os achados de Solomonn & Magro (2008) e Wada et al., (2010).

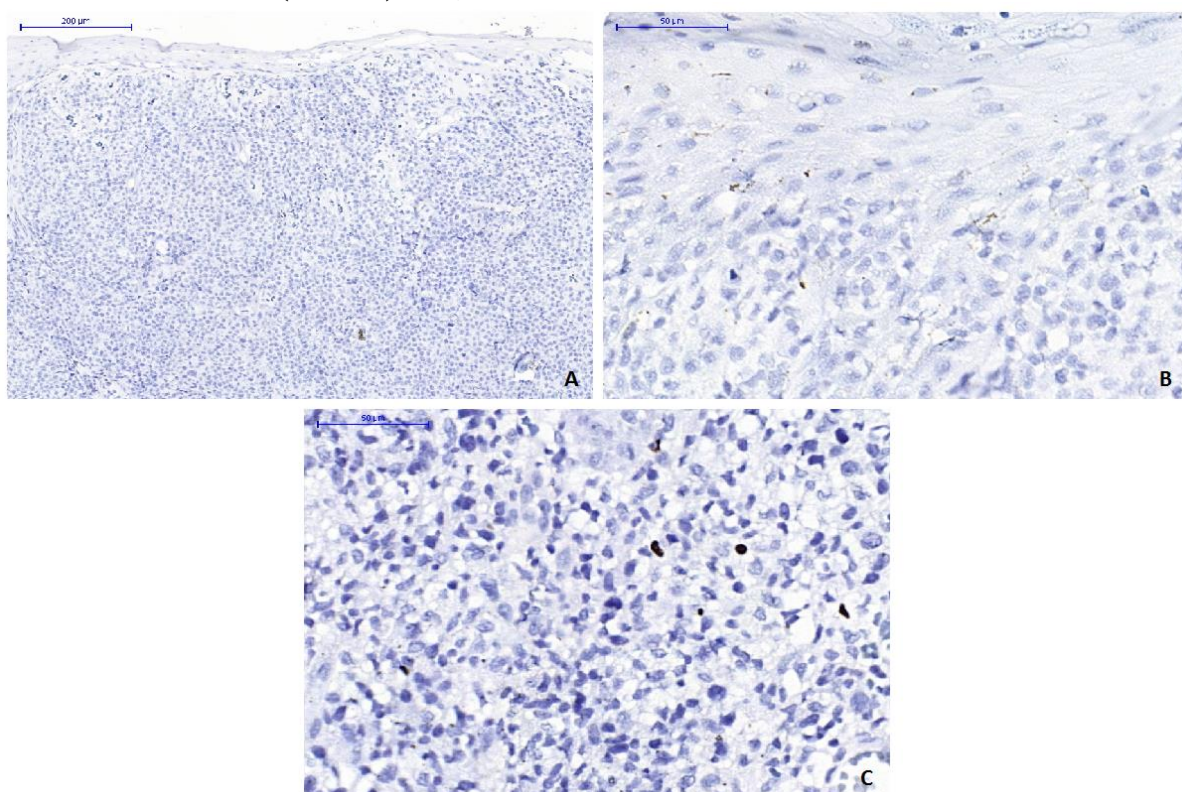
Loser et al., (2006) descreveram a presença do receptor ativador de NF- κ B (RANK) e seu ligante RANKL que é expresso nos queratinócitos de doenças inflamatórias. A superexpressão de RANKL nos queratinócitos resulta das alterações funcionais das células dendríticas epidérmicas e aumenta o número de células reguladoras CD4+CD25+, o que embasa a presença do FOXP3+ em maior proporção nas dermatoses inflamatórias do que na MF.

A perda ou diminuição da expressão do FOXP3 reflete uma anormalidade no gene *foxp3* capaz de desencadear doenças autoimunes devido a falha em gerar células Tregs funcionantes, cuja diminuição dessas células Treg funcionantes na MF em relação às dermatoses inflamatórias pode refletir numa permissividade do sistema imune quanto a proliferação monoclonal de células T, possibilitando a transformação maligna (Solomon & Magro, 2008). Enquanto que o aumento da expressão do FOXP3 em células T podem conferir um fenótipo de células Treg com atividade supressora (Wan et al., 2007, Bacchetta et al., 2006, Yagi et al., 2004), que foi o constatado no grupo 2.

A maior parte das células FOXP3+ corresponderam ao infiltrado linfóide reativo das lesões e raras células T neoplásicas atípicas, concordando com os estudos de Solomon & Magro, (2008) e Wada et al., (2010).

Gjerdrum et al., (2007) indicaram que a presença de células Treg FOXP3+ nos linfomas cutâneos de células T associava-se a um estágio mais precoce da doença e num aumento de sobrevida dos pacientes, inclusive nos casos de MF, a análise estatística em nosso estudo assim como no de Fried & Cerroni, (2012) não foi significativa entre a diferença de infiltrado do FOXP3+ na MF em fases clínicas iniciais e na fase tumoral, porém nossa amostra da progressão de MF para a fase tumoral foi de apenas 5 pacientes. Mas constatamos que há intensa redução ou ausência de células Treg FOXP3+ nas fases tumorais de MF (Figura 9).

Figura 9 – Micose fungoide em fase tumoral; A) Infiltrado linfocitário atípico estendendo-se à derme reticular e ausência da expressão do FOXP3 (escore 0). IHQ, técnica da ABC, 50X; B) Ausência do FOXP3 nos linfócitos epidérmicos, IHQ, técnica da ABC, 400X; C) Ausência da expressão do FOXP3 nos linfócitos dérmicos (escore 0). IHQ, técnica da ABC, 400X



Fonte: o autor

9 CONCLUSÃO

As alterações histopatológicas para o diagnóstico da micose fungoide nas fases clínicas iniciais podem ser inespecíficas e mimetizar dermatoses inflamatórias. Portanto, há necessidade de estreita correlação entre o quadro clínico e os critérios morfológicos.

Após a avaliação retrospectiva de casos de micose fungoide em estágio I e II verificou-se que alguns pacientes em que a hipótese persistiu, necessitaram de sequência de biópsias até a confirmação diagnóstica.

Além das alterações morfológicas avaliadas na coloração de hematoxilina e eosina, alguns casos necessitaram do perfil imunoistoquímico para que se obtivesse diagnóstico de certeza.

O anticorpo anti-FOXP3, cuja positividade está associado a presença de células T reguladoras, que participam da modulação do sistema imunológico e está diretamente relacionado ao infiltrado linfocitário observado tanto nas dermatoses inflamatórias quanto na micose fungoide foi o principal objeto da nossa pesquisa.

Constatou-se significância na redução na expressão do FOXP3 intraepidérmico dos casos de micose fungoide quando comparados ao infiltrado linfocitário FOXP3+ intraepidérmico dos casos de dermatite subaguda espongíotica, psoríase e líquen plano.

E, mesmo entre essas três doenças inflamatórias, identificou-se positividade ainda maior do FOXP3 nos linfócitos intraepidérmicos do líquen plano.

Durante o período de quinze anos de acompanhamento dos pacientes com micose fungoide em fase clínica inicial, apenas 16,6% evoluíram para a fase tumoral de micose fungoide o que sugere bom prognóstico inerente ao estadiamento quando do diagnóstico e/ou correto acompanhamento terapêutico.

Embora a análise estatística não tenha sido significativa quanto a imunomarcção do FOXP3 entre o grupo de pacientes com micose fungoide comparadas aos pacientes que evoluíram para a fase tumoral, observou-se importante redução na expressão do FOXP3 no infiltrado linfocitário nos casos de micose fungoide na fase tumoral em relação aos estádios I e II.

Portanto, recomenda-se o uso do anticorpo anti-FOXP3 junto ao perfil de marcadores imunoistoquímicos consagrados para o auxílio diagnóstico da micose fungoide em fases clínicas iniciais que fizerem diagnóstico diferencial com o grupo eczema, psoríase e líquen plano como auxiliar diagnóstico.

REFERÊNCIAS

ANDRADE V.P.; CUNHA I.W.; SILVA E.M.; AYALA F.; SATO Y.; FERREIRA S.S. et al. O arranjo em matriz de amostras teciduais (tissue microarray): larga escala e baixo custo ao alcance do patologista. J Bras Patol Med Lab 2007; 43(1):55-60.

BACCHETTA R.; PASSERINI L.; GAMBINERI E.; DAI M.; ALLAN S.E.; PERRONI L. et al. Defective regulatory and effector T cell functions in patients with FOXP3 mutations. J Clin Invest 2006; 116: 1713-1722.

BAUM C.; LIU V. Inflammatory Mimics of Mycosis Fungoides. Pathology Case Reviews 2011; 16: 45-51.

BERGER C.L.; TIGELAAR R.; COHEN J.; MARIWALLA K.; TRINH J.; WANG N.; EDELSON R.L. Cutaneous T-cell lymphoma: malignant proliferation of T-regulatory cells. Blood 2005; 105(4): 1640-7.

BEYER M.; MOBS M.; HUMME D.; STERRY W. Pathogenesis of Mycosis fungoides. JDDG 2011; 9: 1-5.

BINAZZI M. Some research on parapsoriasis and lymphoma. Arch Dermatol Res 1977; 258: 17-23.

CARRERAS J.; LOPEZ-GUILLERMO A.; FOX B.C.; COLOMBO L.; MARTINEZ A.; RONCADOR G. et al. High numbers of tumor infiltrating FOXP3 positive regulatory T cells are associated with improved overall survival in follicular lymphoma. Blood 2006; 108: 2957-2964.

CERRONI L.; GATTER K.; KERL H. Mycosis fungoides. In: Skin lymphoma. The illustrated guide. Cerroni L, Gatter K, Kerl H. Eds. Wiley-Blackwell. Oxford-UK. 3rd Ed. 2009. Chp.2, p.11-56.

ELDER E.D.; ELENITSAS R.; MURPHY G.F. et al. Lever's Histopathology of the skin. 10th ed, Lippincott Williams & Wilkins, 2009; 936-944.

FRIED I.; CERRONI L. FOXP3 in sequential biopsies of progressive mycosis fungoides. Am J Dermatopathol 2012; 34: 263-265.

FUJIMURA T.; OKUYAMA R.; ITO Y.; AIBA S. Profiles of Foxp3+ regulatory T cells in eczematous dermatitis, psoriasis vulgaris and mycosis fungoides. Br J Dermatol Jun 2008; 158(6): 1256-63. [PubMed: 18363755]

HOOS A. et al. Validation of tissue microarrays for immunohistochemical profiling of cancer specimens using the example of human fibroblastic tumors. Am J Pathol 2001; 158 (4): 1245-51.

GJERDRUM L.M.; WOETMANN A.; ODUM N.; BURTON C.M.; ROSSEN K.; SKOVGAARD G.L. et al. FOXP3⁺ regulatory T cells in cutaneous T-cell lymphomas: association with disease stage and survival. *Leukemia* Dec 2007; 21(12): 2512-8.

GUITART J.; KENNEDY J.; RONAN S.; CHMIEL J.S.; HSIEGH Y.C.; VARIAKOJIS D. Histologic criteria for the diagnosis of mycosis fungoides: proposal for a grading system to standardize pathology reporting. *J Cutan Pathol* 2001; 28: 174-78.

JAWED S.I.; MYSKOWSKI P.L.; HORWITZ S.; MOSKOWITZ A.; QUERFELD C. Primary cutaneous T-cell lymphoma (mycosis fungoides and Sézary syndrome) Part I. Diagnosis: Clinical and histopathologic features and new molecular and biologic markers. *J Am Acad Dermatol* 2014; 70(2): 205e1-205e16.

KEEHN C.A.; BELONGIE I.P.; SHISTIK G.; FENSKE N.A.; GLASS L.F. The diagnosis, staging and treatment options for mycosis fungoides. *Cancer Control* 2007; 14: 102-111.

LOSER K.; MEHLING A.; LOESER S. et al. Epidermal RANKL controls regulatory T-cell numbers via activation of dendritic cells. *Nat Med* 2006; 12: 1372-9.

OLSEN E.; VONDERHEID E.; PIMPINELLI N. et al. Revisions to the staging and classification of mycosis fungoides and Sézary syndrome: a proposal of the International Society of Cutaneous Lymphoma (ISCL) and the cutaneous lymphoma task force of the European Organization of Research and Treatment of Cancer (EORTC). *Blood* 2007; 110: 1713-22.

RALFKIAER E.; CERRONI L.; SANDER C.A.; SMOLLER B.R.; WILLEMZE R. In: WHO Classification of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Swerdlow, S.H., Campo, E., Harris, N.L., Jaffe, E.S., Pileri, S.A., Stein, H., Thiele, J., Vardiman, J.W. Eds. WHO Press. Geneva Swz. 2008; Pg: 296-308.

Reddy K, Bhawan J. Histologic mimickers of mycosis fungoides: a review. *J Cutan Pathol* 2007; 34: 519-525.

RIZYL M.A.; EVENS M.S.T.; NELSON B.P.; ROSEN S.T. T-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 2008; 107: 1255-1284.

SAKAGUCHI S.; SAKAGUSHI N.; ASANO M.; ITOH M.; TODA M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 1995; 155: 1151-1164.

SOLOMON G.J.; MAGRO C.M. Foxp3 expression in cutaneous T-cell lymphocytic infiltrates. *J Cutan Pathol* Nov; 2008; 35(11): 1032-9. [PubMed: 18681861]

WADA D.A.; WILCOX R.A.; WEENIG R.H.; GIBSON L.E. Paucity of intraepidermal FOXP3-positive T cells in cutaneous T-cell lymphoma in contrast with spongiotic and lichenoid dermatitis. *J Cutan Pathol* 2010; 37: 535-541.

WAN Y.Y.; FLAVELL R.A. Regulatory T-cell functions are subverted and converted owing to attenuated Foxp3 expression. *Nature* 2007; 445: 766-770.

WILLEMZE R.; JAFFE E.L.; BURG G. et al. WHO-EORTC classification for cutaneous lymphomas. *Blood* 2005; 105: 3768-85.

WILLEMZE R.; MEIJER C.J.L.M. Classification of cutaneous T-cell lymphoma: from Alibert to WHO-EORTC. *J Cutan Pathol* 2006; 33(suppl.1): 18-26.

YAGI H.; NOMURA T.; NAKAMURA K.; YAMAZAKI S.; KITAWAKI T.; HORI S. et al. Crucial role of FOXP3 in the development and function of human CD25+CD4+ regulatory T cells. *Int Immunol* 2004; 16: 1643-1656.

ZOU W. Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nat Rev Immunol* Apr 2006; 6(4): 295-307.

ANEXO I

A reação imunoistoquímica foi realizada de acordo com o protocolo de imunoperoxidase de tecido incluído em parafina conforme segue:

- 1- Desparafinização e recuperação antigênica pelo calor PT LINK (DAKO) por 20 minutos.
- 2- Procedimento da técnica automatizada (DAKO Autostainer Link 48): Bloqueio da peroxidase endógena por 5 minutos; incubação do anticorpo primário por 30 minutos; incubação do anticorpo secundário Em Vision Flex por 20 minutos; revelação pelo cromógeno DAB por 5 minutos; contracoloração com hematoxilina segundo Harris por 5 minutos.
- 3- Desidratação em 4 cubas com etanol absoluto e diafanização em 3 cubas com xilol.
- 4- Por fim as lâminas foram montadas com lamínulas por meio de resina sintética Permount (FISHER –SP 15-500).

ANTICORPOS UTILIZADOS NAS REAÇÕES DE IMUNOISTOQUÍMICA PELO MÉTODO DO COMPLEXO AVIDINA-BIOTINA-PEROXIDASE (ABC)

ANTICORPO	FABRICANTE	CLONE	DILUIÇÃO
Anti-CD3 policlonal de coelho	Dako		Pronto para uso
Anti-CD4 monoclonal de coelho	Dako	SP35	Pronto para uso
Anti-CD8 monoclonal de camundongo	Dako	C8/144B	Pronto para uso
Anti-CD20 monoclonal de camundongo	Dako	L26	Pronto para uso
Anti-CD30 monoclonal de camundongo	Dako	Ber-H2	Pronto para uso
Anti-FOXP3 monoclonal de camundongo	Abcam	236 A/E7	1:100

FONTE: o autor (2015)

ANEXO II

Técnica do arranjo em matriz de amostras teciduais (TMA).

Tissue Arrayer Veridiam VTA-100

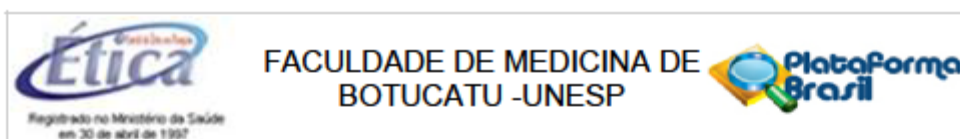
PROCEDIMENTO DE OPERAÇÃO

- 1- Preparar uma planilha para identificação dos blocos doadores no bloco de TMA. Essa planilha pode ser feita utilizando letras na vertical e números na horizontal (a quantidade depende de quantos cassetes existem no seu protocolo), dessa forma cada bloco doador será reconhecido por uma letra e um número.
- 2- Antes de ir para o aparelho, é necessário que se tenha uma lâmina de H.E. de cada bloco organizados em uma bandeja.
- 3- Colocar o cassete plástico contendo o material a ser doado no suporte para bloco doador (primeiro suporte). A alavanca do lado direito do suporte é levantada para que o bloco possa ser inserido.
- 4- Definir a altura da agulha doadora utilizando o botão giratório, localizado em cima do aparelho, enquanto cuidadosamente abaixa a agulha até que ela chegue à altura do plástico do cassete. Definir esta altura adequadamente vai permitir que a agulha perfure a parafina e pare antes de chegar ao cassete plástico
- 5- Colocar um cassete de plástico padrão, contendo bloco de parafina branco (bloco receptor), no suporte para bloco receptor (segundo suporte). A alavanca do lado direito do suporte é levantada para o bloco possa ser inserido.
- 6- Destruar o palco, baixando a alavanca localizada na parte frontal inferior e no centro do equipamento e deslizar até que o bloco receptor esteja sob a agulha de doadores. Use o botão de ajuste de altura no suporte do bloco receptor para abaixar o bloco receptor. Trazer cuidadosamente a agulha doadora inferior, até que esteja completamente abaixada, e, em seguida, levantar cuidadosamente o bloco receptor girando o botão localizado abaixo do suporte do bloco receptor. A posição final adequada é alcançada quando a ponta da agulha de doador se situar na superfície de topo do bloco receptor.
- 7- Deslize a fase para colocar o bloco receptor sob a agulha destinatário, colocar o bloco receptor ligeiramente para o lado da agulha destinatário utilizando o botão giratório, localizado em cima do aparelho ajuste cuidadosamente a agulha do destinatário para que ela pare um pouco acima do cassete de plástico.
- 8- Determinar o padrão de grade desejado centralizar a agulha destinatário acima do bloco receptor, e de acordo com o tamanho da agulha a ser utilizada, estabelecer a posição A1. Para cada calibre de agulha, usar uma distância entre o implante, sendo que um clique corresponde a meia volta do botão. Utilizamos a agulha de 1,0 mm = dois cliques.

- 9- Pressionar para baixo sobre o porta-agulha destinatário, suavemente introduzir a parafina, e continuam para a parte inferior do curso da agulha. Enquanto na parte inferior, gire a alavanca azul de adquirir e desalojar o núcleo de parafina do bloco. Permitir que a mola levante a agulha destinatário para o topo do seu curso. Em seguida, remova o núcleo parafina da agulha, pressionando o êmbolo localizado na parte superior da porta-agulha. O núcleo de parafina é ejetado para fora da extremidade da agulha. Criou-se uma abertura, na posição A1, em que você vai colocar o seu primeiro núcleo tecido do bloco doador. Obs: primeiro implante (A1), serve de orientação da planilha, introduzir um tecido diferente dos demais e dar uma distância da margem de pelo menos 5 mm no bloco receptor para não fragilizar-lo.
- 10- Com o auxílio das manivelas localizadas abaixo do chariot (extremidade direita do equipamento), posicionar a área de interesse do bloco doador no curso da agulha.
- 11- Pressione para baixo o suporte da agulha de doadores, suavemente entrar no tecido, e continue até o final da viagem da agulha. Após, gire a alavanca azul de adquirir e desalojar o núcleo tecido do bloco. Permitir que a mola para levantar a agulha destinatário para o topo do seu curso.
Obs: Se notar que a espessura da amostra que está no bloco doador é fina, reduza o alcance de profundidade da agulha e colha outra amostra do ponto de interesse, introduzir um núcleo sobre o outro.
- 12- Mova o suporte do bloco do destinatário para posicionar a agulha doadora acima posição A1. Pressionando o êmbolo localizado na parte superior da porta-agulha, ejetar o núcleo do bloco doador na abertura, na posição A1.
- 13- Registrar na planilha de orientação no campo A1 a identificação do bloco doador.
- 14- Em seguida, mova o suporte do bloco do destinatário para posicionar a agulha destinatária, girar o botão localizado na lateral esquerda do aparelho, dois cliques (sentido horário) e repita o procedimento para se criar a nova abertura no local B1 e remover o núcleo de parafina e inserir o conteúdo do novo bloco doador, como foi feito para posição A1.
- 15- Repetir o procedimento sucessivamente até o término do bloco receptor, após, girar o botão localizado na parte frontal do aparelho, ao lado da alavanca de deslizamento da plataforma, dois cliques (sentido horário), girar o botão localizado na lateral esquerda do aparelho, até que a agulha do bloco receptor seja direcionada ao lado da posição A1.
- 16- Iniciar a carreira de doadores A2, levar a lâmina de HE do próximo bloco doador ao microscópio, analisar, encontrar um ponto de interesse e marca-lo com caneta retro projetor preta.
- 17- Sobrepor a lâmina no bloco doador e transferir a marcação com caneta de retro projetor preta para facilitar a visualização no bloco receptor após o implante.

- 18- Repetindo os procedimentos de A1, e assim sucessivamente até o término do bloco de TMA.
- 19- Após término do bloco de tma, levar em uma chapa aquecida e deslizar na superfície para fixação dos implantes.

ANEXO III



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: POSITIVIDADE DO IMUNOMARCADOR FOXP3 EM CÉLULAS T REGULADORAS EM LESÕES DE MICOSE FUNGOIDE EM FASES CLÍNICAS INICIAIS E EM DERMATOSES INFLAMATÓRIAS COMO FATOR AUXILIAR PARA O DIAGNÓSTICO

Pesquisador: Thamy Yamashita Shibayama

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 42996215.3.0000.5411

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio
MINISTERIO DA CIENCIA, TECNOLOGIA E INOVACAO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.013.484

Data da Relatoria: 08/04/2015

Apresentação do Projeto:

OS autores fazem uma introdução a respeito de linfomas cutâneos primários e o subtipo predominante que é a micose fungoide. A patogênese da Micose Fungoide não está esclarecida e a hipótese de que células T reguladoras (Treg) participem do processo não foi ainda explorada. O diagnóstico precoce da Micose Fungoide tem valor para o prognóstico de cada paciente individualmente. A possibilidade de que o marcador de células Treg (FOXP3) possa se expressar de forma distinta nas fases iniciais da Micose Fungoide comparada com a expressão nas dermatoses inflamatórias que são seus principais diferenciais histopatológicos será o objeto de investigação.

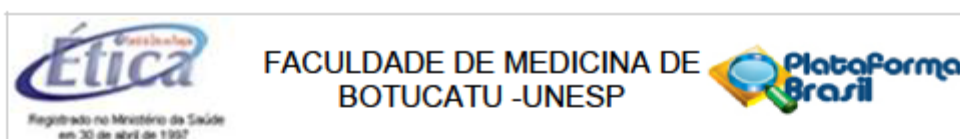
Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Comparar a presença de linfócitos T reguladores, através da expressão de marcadores FOXP3 nos casos de Micose Fungoide em fases iniciais e a expressão do FOXP3 nas principais dermatoses inflamatórias que são os principais diagnósticos diferenciais da MF nesse estágio.

Objetivo Secundário:

Endereço: Chácara Butignoli, s/n
Bairro: Rubião Junior
UF: SP **Município:** BOTUCATU
Telefone: (14)3880-1608
CEP: 18.618-970
E-mail: capellup@fmb.unesp.br



Continuação do Parecer: 1.013.484

Identificar e quantificar de forma semiquantitativa a presença de células T reguladoras através dos marcadores capazes de identificar linfócitos T e nelas quantificar a expressão imunohistoquímica do FOXP3 nos casos de Micose Fungoide em fases clínicas iniciais, e comparar com a presença ou não do marcador em casos de psoríase vulgar, dermatite eczematosa e líquen plano.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Serão utilizadas lâminas de pacientes já previamente diagnosticados e estocadas no Serviço de Patologia da FMB-HCFMB. Os reagentes serão providenciados pelos pesquisadores. Em princípio é atividade de rotina dos Servidores do Serviço e plenamente atualizados. Para os pacientes não há o mínimo risco, pois não se prevê biópsia adicional ou qualquer iniciativa semelhante.

Benefícios:

O diagnóstico de Micose Fungoide nas suas fases clínicas iniciais é muito difícil e, não raro é preciso utilizar várias biópsias em diferentes períodos de tempo para conseguir o diagnóstico de certeza. Assim, um painel reforçado com o marcador para FOXP3 possa reforçar ou antecipar o diagnóstico histológico. O diagnóstico precoce tem impacto, claro, no prognóstico.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Serão utilizadas 80 lâminas divididas em dois grupos: 30 para dermatoses inflamatórias e 30 para micoses fungoides. Comparações serão feitas utilizando análise descritiva.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

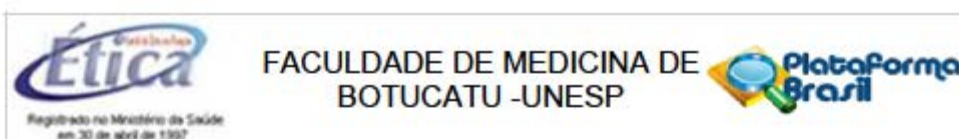
Foram apresentados todos os documentos exigidos por este CEP. Como o projeto utilizará dados secundários, os autores solicitam a dispensa do TCLE justificando que as lâminas estão arquivadas e estocadas no Departamento de Patologia da FMB e não implicará em mudanças no acompanhamento dos pacientes.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto pode ser aprovado sem necessidade de encaminhar à CONEP

Endereço: Chácara Butignoli, s/n
 Bairro: Rubião Junior CEP: 18.618-970
 UF: SP Município: BOTUCATU
 Telefone: (14)3880-1608 E-mail: capellup@fmb.unesp.br



Continuação do Parecer: 1.013.484

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto de Pesquisa APROVADO, deliberado em reunião do CEP de 06 de abril de 2.015, sem necessidade de envio à CONEP.

O CEP esclarece que ao final da execução deste estudo, é necessário encaminhar para análise o respectivo "Relatório Final de Atividades", que deverá ser postado no sistema Plataforma Brasil através de "NOTIFICAÇÃO"

BOTUCATU, 07 de Abril de 2015

Assinado por:
SILVANA ANDREA MOLINA LIMA
(Coordenador)

Endereço: Chácara Butignoli, s/n
Bairro: Rubião Junior
UF: SP Município: BOTUCATU CEP: 18.618-970
Telefone: (14)3880-1608 E-mail: capellup@fmb.unesp.br