ROBERTA VASCONCELOS BERG

Análise comparativa da expressão e atividade das metaloproteinases 2 e 9 e de seus inibidores teciduais nas lesões cutâneas das variantes poiquilodérmica e clássica da micose fungoide.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências
Programa de Dermatologia

Versão corrigida conforme resolução CoPGr6018/11

Orientador: Prof. Dr. José Antonio Sanches Junior

São Paulo
2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Berg, Roberta Vasconcelos

Análise comparativa da expressão e atividade das metaloproteinases 2 e 9 e de seus inibidores teciduais nas lesões cutâneas das variantes poiquilodérmica e clássica da micose fungoide / Roberta Vasconcelos Berg. -- São Paulo, 2016.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Dermatologia.

Orientador: José Antonio Sanches Junior.

Descritores: 1.Micose fungoide 2.Linfoma cutâneo de células T 3.Dermatopatias
4.Metaloproteinases 5.Inibidores teciduais de metaloproteinases 6.Imuno-histoquímica
7.Prognóstico

USP/FM/DBD-151/16

DEDICATÓRIA

Este trabalho é dedicado àqueles que me motivam diariamente a buscar novos conhecimentos: meus pacientes.

Eles são meus maiores professores. Não aprendo só com a sua doença. Aprendo com suas histórias, com a forma como superam os altos e baixos de tratamentos difíceis e como lidam com a presença da doença em suas vidas.

Cada ser humano que confia a mim seu tratamento me concede uma honra e é para eles que me esforço para sempre buscar a superação acadêmica.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. José Antonio Sanches, meu orientador e amigo querido, agradeço pela confiança, amizade, apoio e por me inspirar dia a dia a exercer a minha profissão.

À minha mãe, Nanci Vasconcelos, por me impulsionar a ser quem eu sou e por me incentivar a iniciar este trabalho.

Ao meu pai, Gualberto, que de algum lugar me protege e me inspira a seguir o caminho do saber.

Ao meu irmão, Gabriel, por estar sempre ao meu lado.

Ao meu marido Felipe Berg, pelo suporte, parceria e amor ao longo destes anos.

A todos aqueles que me ajudaram neste trabalho e fizeram seu acréscimo para que essa tese fosse possível:

- À Prof^a. Dra. Camilla Fanelli
- À Prof^a. Dra. Neusa Yuriko Sakai Valente
- Ao Prof. Dr. Roberto Zatz
- À Prof^a Dra. Juliana Pereira
- Aos funcionários do Laboratório de Histopatologia do Departamento de Dermatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
- Aos funcionários do Laboratório de Imunofluorescência do Departamento de Dermatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

- Aos funcionários da administração e da biblioteca da Divisão de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
- Aos funcionários do Laboratório de Dermatologia e Imunodeficiências (LIM-56) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
- Aos funcionários do Laboratório de Fisiopatologia Renal (LIM-16) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
- Aos funcionários do Laboratório de Genética e Hematologia Molecular (LIM-31) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
- Aos funcionários da Divisão de Arquivo Médico do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
- Aos colegas do Ambulatório de Oncologia Cutânea do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Essa tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento dessa publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Annelise Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddy, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviatura dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals in Index Medicus*.

Vasconcelos R. Análise comparativa da expressão e atividade das metaloproteinases 2 e 9 e de seus inibidores teciduais nas lesões cutâneas das variantes poiquilodérmica e clássica da micose fungoide [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2016.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Micose fungoide	1
1.1.1	Aspectos clínicos	1
1.1.2	Histologia e imuno-histoquímica	4
1.1.3	Imunofenotipagem do sangue periférico	5
1.2	Micose fungoide poiquilodérmica (MFp)	6
1.2.1	Aspectos clínicos	6
1.2.2	Aspectos diagnósticos	8
1.3	Metaloproteinases e seus inibidores teciduais	11
1.4	MMP e câncer	15
1.4.1	Sinalização de fatores de crescimento	15
1.4.2	Regulação da apoptose	15
1.4.3	Angiogênese	15
1.4.4	Invasão e metástase	16
1.4.5	Formação do nicho metastático	16
1.5	MMP2	18
1.5.1	MMP2 na pele normal	18
1.5.2	MMP2 nos linfomas não Hodgkin (LNH)	18
1.5.3	MMP2 nos linfomas cutâneos	19
1.6	TIMP-2	21
1.6.1	TIMP-2 na pele normal	21
1.6.2	TIMP-2 nas neoplasias hematológicas	21
1.6.3	TIMP-2 nos linfomas cutâneos	21
1.7	MMP9	22
1.7.1	MMP9 na pele normal	22
1.7.2	MMP9 nos linfomas não-Hodgkin	22
1.7.3	MMP9 nos linfomas cutâneos	23
1.8	TIMP-1	24
1.8.1	TIMP-1 na pele normal	24
1.8.2	TIMP-1 nos linfomas não-Hodgkin	24
1.8.3	TIMP-1 nos linfomas cutâneos	24
2	OBJETIVOS	25

2.1	Principais	25
2.2	Secundários	25
3	MÉTODOS	26
3.1	Seleção dos grupos e critérios de inclusão.....	26
3.2	Análise epidemiológica e clínica	31
3.3	Análise histopatológica	32
3.4	Marcação imuno-histoquímica	34
3.4.1	Marcadores de células T comumente pesquisados na micose fungoide: CD3, CD4, CD7 e CD8.	34
3.4.2	Metaloproteinases e seus inibidores: MMP2, TIMP-2, MMP9, TIMP-1.....	35
3.5	Análise das lâminas de imuno-histoquímica	37
3.5.1	Anticorpos para marcadores de membrana de células T (CD3, CD4, CD7, CD8).....	37
3.5.2	Anticorpos para MMP e TIMP	38
3.6	Análise de atividade de metaloproteinases – zimografia em gelatina	40
3.6.1	Extração de proteínas.....	41
3.6.2	Eletroforese das proteínas em gel de acrilamida/gelatina e reação de digestão enzimática	41
3.6.3	Quantificação da atividade das gelatinases.....	42
3.7	Análise estatística	43
4	RESULTADOS	44
4.1	Estudo dos casos de micose fungoide poiquilodérmica.....	44
4.1.1	Epidemiologia e apresentação clínica.....	44
4.1.2	Histopatologia	48
4.1.3	Imuno-histoquímica.....	50
4.1.4	Clonalidade T	51
4.2	Presença e atividade das metaloproteinase e TIMP	52
4.2.1	Presença de MMP2 avaliada por imuno-histoquímica	52
4.2.2	Medição da atividade de MMP2 por zimografia em gelatina	57
4.2.1	Presença de TIMP-2 avaliado por imuno-histoquímica... 59	
4.2.2	Presença de MMP9 avaliada por imuno-histoquímica	63
4.2.3	Medição da atividade de MMP9 por zimografia em gelatina	68
4.2.4	Presença de TIMP-1 avaliado por imuno-histoquímica... 70	

5	DISCUSSÃO	76
5.1	Estudo dos casos de micose fungoide poiquilodérmica – aspectos demográficos, clínico-patológicos e fenotípicos.....	76
5.2	Presença e atividade das metaloproteinase e TIMP	80
6	CONCLUSÕES	86
6.1	Principais	86
6.2	Secundárias	87
7	PERSPECTIVAS FUTURAS	88
8	ANEXOS.....	89
9	REFERÊNCIAS	98

LISTA DE ABREVIATURAS

Et. al.: *et alia* (do latim: e outros)

P. ex.: por exemplo

LISTA DE SIGLAS

CD – *cluster of differentiation* (grupo de diferenciação)

EORTC – *European Organization for Research and Treatment of Cancer*
(Organização Europeia para Pesquisa e Tratamento do Câncer)

LNH – linfoma não-Hodgkin

MEC – matriz extracelular

MF – micose fungoide

MF_i – micose fungoide clássica inicial

MF_p – micose fungoide poiquilodérmica

MF_{pG} – micose fungoide poiquilodérmica generalizada

MF_{pL} – micose fungoide poiquilodérmica localizada

MF_{pM} – micose fungoide poiquilodérmica mista

MFT – micose fungoide tumoral

MFT_{nT} – micose fungoide tumoral não-transformada

MFTT – micose fungoide tumoral transformada

MMP - metaloproteinase

mRNA – ácido ribonucleico mensageiro

NK – *natural killer*

PCR – *polimerase chain reaction* (reação de polimerase em cadeia)

PLC – pitíriase liquenoide crônica

PUVA - ultravioleta A com psoralênico

RNA – ácido ribonucleico

SS – síndrome de Sézary

TIMP – *Tissue inhibitor of metalloproteinase*

UVA – ultravioleta A

UVB-NB – *ultravioleta B narrow-band* (banda estreita)

VEGF – *vascular endothelium grow factor* (Fator de crescimento do endotélio capilar)

WHO – *World Health Organization* (Organização Mundial de Saúde)

RESUMO

Berg RV. *Análise comparativa da expressão e atividade das metaloproteinases 2 e 9 e de seus inibidores teciduais nas lesões cutâneas das variantes poiquilodérmica e clássica da micose fungoide* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016.

Introdução: Micose fungoide poiquilodérmica (MFp) é uma variante clínica de micose fungoide (MF). É mais indolente e caracterizada pela presença da poiquidermia. As metaloproteinases (MMP) e seus inibidores específicos TIMP (*Tissue Inhibitors of Metaloproteinases*) estão envolvidos na oncogênese. Especificamente as MMP2 e MMP9 e seus inibidores, TIMP-2 e TIMP-1, respectivamente, foram relacionados ao prognóstico em tumores. Poucos trabalhos estudaram MMP e nenhum estudou a ação dos TIMP na MF. **Objetivos:** avaliar a relação entre MMP2 e MMP9 e seus inibidores TIMP2 e TIMP1 e a agressividade da MF e descrever a casuística de micose fungoide poiquilodérmica no ambulatório de linfomas cutâneos da Divisão de Clínica Dermatológica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. **Métodos:** análise retrospectiva de 54 casos de MFp, sendo 25 de MFp localizada 14 de MFp generalizada e 15 de MFp mista. Para análise das MMP e TIMP, os grupos de MFp foram comparados com 7 amostras de pele normal (PN), 10 casos de MF clássica inicial (MFi), 9 casos de MF tumoral não-transformada (MFT nt) e 10 de MF tumoral transformada (MFT t). **Resultados:** A proporção de mulheres: homens foi 2,44. MFp apresentou maior tempo entre os primeiros sintomas e o diagnóstico. MFpG apresentou maior prevalência de lesões do tipo pitíriase liquenoide crônica (PLC) (79%). Houve alta prevalência de MF hipocromiante (62%) no grupo MFp mista. A histologia da MFp apresentou características típicas de MF e, adicionalmente, atrofia, telangectasias e derrame pigmentar, específicos da forma poiquilodérmica. Na imuno-histoquímica predominou o fenótipo CD3+, CD4+, CD7-, CD8- em todos os grupos, e MFp apresentou significativamente menor predomínio do fenótipo CD8+ que o grupo MFi. O grupo MFpG apresentou baixa positividade para pesquisa de clonalidade T da pele (12,5%). A MMP2 esteve mais presente na epiderme em MFi e MFp relativamente a MFT. Na derme superficial, os grupos MFi e MFp marcaram mais MMP2 que a pele normal, mas sem diferença estatística entre eles. Não houve diferença estatística em MMP2 na derme profunda entre os grupos. À zimografia, houve maior atividade de MMP2 ativa no grupo MFTt. Não houve expressão de TIMP-2 pela epiderme da pele normal. Os grupos MFi e MFp marcaram TIMP-2 na epiderme de forma semelhante, porém menos que os grupos MFT. Na derme superficial, não houve diferença estatística entre os grupos MFi e MFp. TIMP-2 foi mais expresso na derme profunda dos dois grupos de MFT comparativamente a todos os outros grupos. Na epiderme e na derme superficial, MMP9 foi mais expressa no grupo MFi comparativamente a MFp. Na derme profunda, a expressão de MMP9 foi maior nos grupos MFT, seguido por MFi e, por último, MFp. A atividade de MMP9 foi maior no grupo MFT não transformada

comparativamente aos outros grupos. TIMP-1, na epiderme e na derme superficial e na derme profunda foi mais expresso no grupo MF_i, comparativamente aos outros grupos. **Discussão:** MFpG apresentou mais lesões tipo PLC e a forma mista, lesões hipocrômicas. A histologia da MFp foi semelhante à descrita previamente na literatura, mas a baixa positividade de CD8 difere de relatos prévios. A MMP2 pareceu ser um marcador de atividade para MF, principalmente quando a sua presença por imunohistoquímica foi associada a dados de zimografia. A expressão de MMP9 nas amostras foi compatível com os dados prévios de literatura, tendo sido mais expressa nas formas mais agressivas de MF e, histologicamente, mais localizada nos locais de maior atividade do tumor. TIMP-1 foi expresso de forma análoga à MMP9, conforme descrito previamente na literatura. TIMP-2, por sua vez, seguiu o padrão de distribuição de MMP2. No entanto, não foi expresso pela pele normal e foi mais expresso pelos grupos de MFT, o que não ocorreu com a MMP2 na imuno-histoquímica. **Conclusões:** A expressão de MMP e TIMP correlacionou-se com o local de maior atividade linfocitária e com a agressividade da MF. A atividade da MMP2 e MMP9 foi maior nos grupos MFT comparativamente aos grupos mais indolentes. Separar os casos de MFp de acordo com suas apresentações localizadas, generalizada e mista foi relevante do ponto de vista clínico, laboratorial e evolutivo.

Descritores: micose fungoide; linfomas cutâneos de células T; poiquilodermia, metaloproteinase; inibidor tecidual de metaloproteinase; zimografia; imuno-histoquímica; prognóstico.

ABSTRACT

Berg RV. *A comparative analysis of the expression and activity of metalloproteinases 2 and 9 and their tissue inhibitors in cutaneous lesions of poikilodermatous and classic variants of mycosis fungoides [Thesis].* São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2016.

Introduction: poikilodermatous mycosis fungoides (pMF) is a clinical variant of mycosis fungoides (MF). It is more indolent than classic MF and is characterized by the presence of poikiloderma. The matrix metalloproteinases (MMPs) and their specific inhibitors TIMP (Tissue Inhibitors of Metalloproteinases) are involved in oncogenesis. Specifically, MMP2 and MMP9 and their inhibitors, TIMP-2 and TIMP-1, respectively, have been related to prognosis in tumors. There are few studies on MMP and none on the role of TIMPs in MF.

Objectives: To evaluate if there is a relationship between the presence and activity of MMP2 and MMP9 and their inhibitors TIMP2 and TIMP1, and the aggressiveness of MF. To describe a casuistic of poikilodermatous mycosis fungoides in an outpatient clinic in the Dermatological Division of Hospital das Clinicas of University of Sao Paulo Medical School.

Methods: Retrospective analysis of 54 cases of pMF, this included 25 localized pMF (LpMF), 14 generalized pMF (GpMF) and 15 mixed pMF. For the analysis of MMPs and TIMPs, the pMF groups were compared with 7 normal skin samples (NS), 10 cases of initial classical MF (cMF), 9 cases of non-transformed tumor MF (nt MFT) and 10 transformed tumor MF (t MFT).

Results: The proportion of women : men was 2.44. The pMFs groups showed a longer period of time from the first symptoms to the diagnosis than the cMF group. The GpMF group had a higher incidence of pityriasis lichenoides chronica-like lesions (PLC) (79%) than the other groups. There was a high incidence of hypopigmented MF (62%) in the mixed pMF group. Histology showed typical characteristics of MF and, additionally, atrophy, telangiectasia and pigmentary alterations compatible with pMF. At immunohistochemistry the cases were predominantly CD3+, CD4+, CD7-, CD8- phenotype in all groups, and the pMF groups had a significantly lower prevalence of CD8+ phenotype than the cMF group. The GPMF group showed low positivity for clonality of the T-cell receptor at the T skin (12.5%) compared to the other groups. The MMP2 was more present in the epidermis for the cMF and pMF groups compared to MFT. In the superficial dermis, the cMF, LpMF and GpMF groups showed more MMP2 than normal skin, however there was no statistical difference between the three groups. There was no statistical difference in the presence of MMP2 in the deep dermis between the groups. The zymography showed higher MMP2 activity in the MFT group. There was no TIMP-2 expression by the normal epidermis. The epidermis of cMF and pMFs groups marked TIMP-2 in a similar way, but at a lower intensity than the MFT groups. In the superficial dermis, there was no statistical difference between the cMF and pMFs groups. TIMP-2 was more expressed in the deep dermis of the two MFT groups compared to all of the other groups. In the epidermis and superficial dermis, the MMP9 was more

expressed in cMF compared to pMF groups. In the deep dermis, MMP9 expression was higher in the MFT groups, followed by cMF and finally pMF. The MMP9 activity was higher in the nt MFT group compared to other groups. TIMP-1, in epidermis, superficial dermis and deep dermis was more expressed in the cMF group compared to other groups.

Discussion: The study confirmed that the pMF is an indolent form of MF and the time period between the symptoms and the diagnosis in pMF was longer than in classical MF. There were clinical differences amongst the groups of pMF. The GpMF group had a higher prevalence of PLC-like lesions than the mixed form of pMF, which had more hypochromic lesions. Histology of pMF was similar to descriptions provided in other case studies. However, the low CD8 positivity differs from previous reports. The MMP2 appeared to be a marker of activity for MF in our work, especially when their presence by immunohistochemistry was associated with the enzyme activity. The expression of MMP9 in our samples was consistent with previous data from other case studies, being more expressed in the most aggressive forms of MF and histologically more localized in most active sites of the tumor. TIMP-1 was expressed in an analogous manner to MMP9, as previously described in the literature. TIMP-2, in turn, followed the distribution pattern of MMP2. However, it was not expressed by normal skin and was more expressed by the MFT group, which did not occur with the MMP2 in immunohistochemistry.

Conclusions: The expression of MMP and TIMP was correlated with the location of higher lymphocyte activity and with the aggressiveness of MF. The activity of MMP2 and MMP9 was higher in the MFT groups than the more indolent groups. It was important to split the pMF cases according to their presentation (GpMF, LpMF and mix pMF) from a clinical, laboratory and prognostic point of view.

Descriptors: mycosis fungoides; cutaneous T-cell lymphoma; poikiloderma, metalloproteinase; tissue inhibitor of metalloproteinase; zymography; immunohistochemistry; prognosis.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Micose fungoide

Micose fungoide (MF) é a forma mais comum de linfoma cutâneo primário (1, 2). Trata-se de uma proliferação neoplásica de linfócitos T residentes na pele.

1.1.1 Aspectos clínicos

A MF, de maneira geral, pode ser dividida em forma clássica e outras variantes.

A MF clássica, por sua vez, é subdividida em apresentações clínicas distintas, segundo sua gravidade. As lesões iniciais são eritemato-descamativas não infiltradas (*patches*). A forma inicial, também denominada por alguns autores parapsoríase em grandes placas, é indolente e tem localização preferencial nas áreas duplamente cobertas (mamas, região glútea, cintura pélvica, axilas).

A história natural da doença mostra evolução dessas lesões mais brandas para placas mais infiltradas e, posteriormente, tumores.

Uma outra apresentação da MF é a eritrodermia, que se caracteriza por eritema e descamação de mais de 90% da superfície corpórea.

A MF, apesar de geralmente indolente, com 90% dos casos mantendo-se restritos à pele, em algumas situações há sistematização da doença, com envolvimento linfonodal e de órgãos sólidos.

A síndrome de Sézary (SS) é considerada a forma leucêmica da MF. Clinicamente apresenta-se como eritrodermia edematosa com ou sem liquenificação, pruriginosa e associada a linfadenopatia generalizada. É frequente a associação com queratodermia palmo-plantar, distrofias ungueais e alopecia (3, 4).

Para caracterização de SS é necessário, além do quadro clínico sugestivo, demonstrar o envolvimento hematológico pelas células neoplásicas. A SS é doença agressiva com prognóstico reservado, com taxa de sobrevida de 5 anos entre 10 e 20% (3-5).

Atualmente a MF e a SS são classificadas clinicamente pelo sistema TNM, pelo qual são agrupadas segundo estágio clínico. A Tabela 1 ilustra o sistema de estadiamento vigente e a Tabela 2, as taxas de mortalidade para cada estágio clínico (5) .

Recomenda-se, na suspeita de MF ou SS, realizar biópsia cutânea em três pontos, para aumentar a sensibilidade do exame.

Tabela 1 - Estadiamento clínico da micose fungoide segundo critérios definidos pela *International Society for Cutaneous Lymphoma – European Organisation for Research and Treatment of Cancer* (ISCL-EORTC) (5)

T (PELE)	
T1	Patches/Placas limitadas (acometendo < 10% da superfície corporal)
T2	Patches/Placas generalizadas (acometendo ≥10% da superfície corporal)
T3	Tumor (es)
T4	Eritrodermia
N (LINFONODO)	
N0	Ausência de linfadenomegalia
N1	Linfadenomegalia, sem acometimento histológico
N2	Linfadenomegalia, com acometimento histológico (arquitetura linfonodal inalterada)
N3	Linfadenomegalia, com acometimento histológico (arquitetura linfonodal alterada)
M (VÍSCERAS)	
M0	Sem acometimento visceral
M1	Com acometimento visceral
B (SANGUE)	
B0	Ausência ou < 5% de células atípicas circulantes (de Sézary) em relação aos linfócitos totais
B1	Baixa carga tumoral (≥ 5% dos linfócitos são células de Sézary, mas não B2)
B2	Alta carga tumoral no sangue (≥ 1000/μL células de Sézary + clone positivo)
ESTÁGIO CLÍNICO	TNMB
IA	T1 N0 M0 B0-1
IB	T2 N0 M0 B0-1
IIA	T1-2 N1-2 M0 B0-1
IIB	T3 N0-2 M0 B0-1
III	T4 N0-2 M0 B0-1
IVA1	T1-4 N0-2 M0 B2
IVA2	T1-4 N3 M0 B0-2
IVB	T1-4 N0-3 M1 B0-2

Tabela 2 - Sobrevida em 10 anos de pacientes com MF conforme a apresentação clínica (5)

Lesões não infiltradas ou placas localizadas (<10% da superfície corpórea)	97%
Lesões > 10% da superfície corpórea	83%
Tumores	42%
Doença linfonodal	20%

1.1.2 Histologia e imuno-histoquímica

À histologia (6, 7) inicialmente, observa-se infiltrado linfocitário em faixa junto à membrana basal da epiderme com poucas ou nenhuma célula atípica. Nessa fase, costuma haver algum grau de epidermotropismo. Conforme a evolução clínica da doença, esse infiltrado fica mais denso, as células ficam maiores e com núcleo convoluto (cerebriforme) e o epidermotropismo fica mais intenso, podendo formar um conjunto de linfócitos atípicos na epiderme (microabscessos de Pautrier). Na evolução para a forma tumoral, o infiltrado linfocitário estende-se à derme e tecidos subcutâneos e o epidermotropismo pode estar ausente. Nessa fase pode haver, além das células com núcleo cerebriforme, células blásticas, com núcleo hipercromático. Geralmente é nessa fase mais avançada que pode haver transformação para linfoma de grandes células anaplásicas, com pior prognóstico.

A imuno-histoquímica das células neoplásicas apresenta um padrão de linfócitos T maduros de memória, CD3+, CD4+, CD45RO+, CD8-. Raros casos podem apresentar o padrão CD3+, CD4-, CD8+. Há perda variável de CD2, CD5 e CD7, o que favorece o diagnóstico.

Na SS, o infiltrado linfomatoso é semelhante ao da MF, entretanto em cerca de 30% dos pacientes com SS o exame histopatológico é inespecífico. Frequentemente o infiltrado celular é monótono com epidermotropismo discreto. Raramente observam-se microabscessos de Pautrier. Os achados fenotípicos e genéticos são parecidos aos da MF.

1.1.3 Imunofenotipagem do sangue periférico

A imunofenotipagem ajuda na caracterização da síndrome de Sézary, como descrito na Tabela 1, assim como pode identificar o envolvimento hematológico nas formas avançadas de MF.

1.2 Micose fungoide poiquilodérmica

1.2.1 Aspectos clínicos

Micose fungoide poiquilodérmica (MFp) é uma forma de micose fungoide (MF) em que, clinicamente, há poiquilodermia, ou seja, lesões dermatológicas que mesclam áreas com hiperpigmentação, hipopigmentação, atrofia e telangectasias. Pode haver também nessas regiões descamação e eritema, principalmente em situações de maior atividade da doença. As lesões poiquilodérmicas ocorrem preferencialmente nas áreas de dobras e nas regiões duplamente cobertas, como mamas e glúteos.

Alguns casos de poiquilodermia são precedidos por pápulas eritêmato-acastanhadas, brilhantes, cobertas por escamo-crostas, semelhantes à pitíriase liquenoide. Essas lesões são distribuídas difusamente na pele. Com a evolução, a pele torna-se adelgada e com aspecto reticulado/ poiquilodérmico, que costuma envolver grandes áreas, podendo levar a um aspecto semelhante à eritrodermia.

O aspecto poiquilodérmico pode, ainda, ocorrer concomitantemente a outras apresentações de MF, como *patches*, placas, tumores e lesões hipocrômicas.

Apesar de oficialmente não ser considerada como uma das variantes clínicas de MF segundo a classificação da *World Health Organization* e da *European Organization of Research and Treatment of Cancer* (WHO-EORTC) de 2005 (1), a literatura médica já considera a MFp como um subtipo de MF mais indolente, em que há maior incidência da expressão de

CD8 em relação à MF clássica (8). Não há estudos epidemiológicos que determinem a incidência dessa forma em relação aos casos de MF ou à população geral

A MFp recebeu, no passado, diversas denominações, como *poikilodermia atrophicans vasculare*, paraqueratose variegata e parapsoríase liquenoide. A primeira descrição da doença foi em 1908, por Jacobi, de um caso que hoje acreditam tratar-se de dermatomiosite (9). Muitas vezes, esses casos, além de poikilodermia, eram descritos com lesões do tipo pitíriase liquenoide crônica concomitantes ou precedendo a poikilodermia. Por muito tempo, a doença foi considerada como uma dermatose benigna, uma vez que seu comportamento era indolente e nem sempre sua histologia trazia infiltrado linfocitário atípico. Em 1948, Bloom et al. (10) encontraram um caso do que clinicamente denominavam *poikilodermia atrophicans vasculare* e que apresentavam características histológicas de MF. Posteriormente, em 1988, demonstrou-se (11) que MFp e a parapsoríase em placa exibiam as mesmas anormalidades de expressão antigênica das células T, o que era consistente com a visão de que a MFp seria uma forma inicial de MF.

Na literatura, há descrição de diferentes apresentações de MF com lesões poikilodérmicas. Farley-Loftus et al (12) descrevem um caso em que havia poikilodermia generalizada, envolvendo mais de 80% da superfície corpórea. No mesmo artigo, é mencionado que, em alguns casos, a poikilodermia pode envolver preferencialmente as regiões flexurais.

Hoje o estadiamento da MFp é feito da mesma forma que na MF clássica. Por essa razão, os casos que apresentam poiquilodermia generalizada acabam sendo classificados como T4, apesar de a literatura sugerir que esses casos teriam um prognóstico diferente da MF clássica eritrodérmica.

1.2.2 Aspectos diagnósticos

1.2.2.1 Histologia

O exame histopatológico da MFp apresenta aspectos comuns ao de outras doenças poiquilodérmicas não neoplásicas, com atrofia epidérmica, vasos sanguíneos dilatados na derme, melanófagos e incontinência pigmentar. O que torna a histologia da MFp singular é a presença de infiltrados linfoides atípicos. É frequente observar epidermotropismo, embora seja rara a presença de microabscessos de Pautrier.

1.2.2.2 Imuno-histoquímica

O perfil imunofenotípico descrito na maior parte dos casos revela o padrão CD2+, CD3+, CD4+, CD7-, CD45RO+, CD8-, que é consistente com o fenótipo de células T *helper* maduras, semelhantes às encontradas nas outras formas de MF. Há, no entanto, maior frequência de positividade de CD8 nos linfócitos tumorais, que pode chegar a até 38% dos casos (8).

1.2.2.3 Clonalidade T

Apenas um trabalho avaliou a presença de clonalidade em uma casuística de MFp (8). Esse trabalho não separou os casos de MFp em grupos com apresentações clínicas distintas e encontrou 79% de clonalidade positiva na pele e 16% no sangue periférico.

1.2.2.4 Tratamento

A terapêutica que tem sido utilizada para o tratamento de MFp é a mesma da MF clássica. Pelas características histológicas de atrofia e derrame pigmentar, sequelares, raramente há regressão completa das lesões com o tratamento. Para formas iniciais e sem acometimento sistêmico têm-se empregado terapêuticas dirigidas à pele, como fototerapia com ultravioleta B *narrow band* (UVB-NB), UVA associado a psoralênico (PUVA), corticosteroides tópicos e quimioterápicos tópicos. Em lesões extensas, além do tratamento anterior, podem ser usados retinoides orais e interferon 2a. Nos casos em que há envolvimento extra-cutâneo, agentes imunológicos (alemtuzumab, denileukin difitox) (12) podem ser usados, assim como quimioterapia sistêmica (8, 13).

1.2.2.5 Evolução e prognóstico

A MFp costuma evoluir de forma indolente, permanecendo restrita à pele por muitos anos. Comparativamente à MF clássica, a MFp apresenta comportamento menos agressivo, e são raras as formas que evoluem para óbito. Um estudo transversal recente com 49 pacientes com MFp mostrou que a maioria dos pacientes encontra-se em estádios iniciais e têm um

maior tempo de evolução da doença comparativamente aos casos de MFi (8).

Um dos grandes desafios no estudo dos linfomas cutâneos é entender, com base na fisiopatologia dos diferentes subtipos de MF e dos diferentes estádios da MF clássica, quais seriam os fatores determinantes para que a doença apresentasse um bom prognóstico ou evoluísse de forma agressiva. Encontrar um marcador de prognóstico poderia ajudar na condução dos casos de forma individualizada, destinando tratamentos mais agressivos aos casos de potencial evolução desfavorável.

1.3 Metaloproteinases e seus inibidores teciduais

As metaloproteinases (MMP) são uma família de endopeptidases zinco-dependentes. Elas são secretadas na forma inativa (zimogênio) e ativadas por um processo dependente de zinco, que ocorre no retículo citoplasmático (14, 15).

As MMP são subdivididas de acordo com seu substrato, seu mecanismo catalítico ou sua homologia estrutural nas seguintes categorias: collagenases, gelatinases, estromelisinases e MMP de membrana (Tabela 3).

Tabela 3 - Subdivisão das metaloproteinases(16).

SUBGRUPO	MMP	NOME	SUBSTRATO
<u>COLAGENASES</u>	MMP-1	Colagenase-1	Colágeno I, II, III, VII, VIII, X, gelatina
	MMP-8	Colagenase-2	Colágeno I, II, III, VII, VIII, X, agrecana, gelatina
	MMP-13	Colagenase-3	Colágeno I, II, III, IV, IX, X, XIV, gelatina
<u>GELATINASES</u>	MMP-2	Gelatinase A	Gelatina, colágeno I, II, III, IV, VII, X
	MMP-9	Gelatinase B	Gelatina, colágeno IV, V
<u>STROMELISINAS</u>	MMP-3	Stromelisina-1	Colágeno II, IV, IX, X, XI, gelatina
	MMP-10	Stromelisina-2	Colágeno IV, laminina, fibronectina, elastina
	MMP-11	Stromelisina-3	Colágeno IV, fibronectina, laminina, agrecana
<u>MATRILISINAS</u>	MMP-7	Matrilisina-1	Fibronectina, laminina, colágeno IV, gelatina
	MMP-26	Matrilisina-2	Fibrinogênio, fibronectina, gelatina
<u>MT-MMP</u>	MMP-14	MT1-MMP	Gelatina, fibronectina, laminina
	MMP-15	MT2-MMP	Gelatina, fibronectina, laminina
	MMP-16	MT3-MMP	Gelatina, fibronectina, laminina
	MMP-17	MT4-MMP	Fibrinogênio, fibrina
	MMP-24	MT5-MMP	Gelatina, fibronectina, laminina
<u>OUTRAS</u>	MMP-25	MT6-MMP	Gelatina
	MMP-12	Metaloelastase de macrófagos	Elastina, fibronectina, colágeno IV
	MMP-19		Agrecana, elastina, fibrilina, colágeno IV, gelatina
	MMP-20	Enamelisina	Agrecana
	MMP-21	XMMP	Agrecana
	MMP-23		Gelatina, caseína, fibronectina
	MMP-27	CMMP	Desconhecido
	MMP-28	Epilisina	Desconhecido

Tabela 3 a: Metaloproteinases e seus substratos

MMP	Inibidores
MMP2	TIMP-2, TIMP-3
MMP9	TIMP-1, TIMP-3

Tabela 3 b: gelatinases e seus inibidores específicos

Essas enzimas estão envolvidas em várias funções fisiológicas, como o remodelamento tecidual e a embriogênese, e patológicas, como algumas doenças autoimunes e o câncer (16).

Sua função mais conhecida é a degradação proteolítica da maioria dos componentes da matriz extracelular. No entanto, sabe-se atualmente que as MMP participam de outros processos, como mediação da sinalização do crescimento celular, regulação de apoptose e angiogênese, além de participarem como mediadoras de cascatas inflamatórias (17).

A função das MMP in vivo depende do balanço local entre sua ativação e sua inibição, que pode ocorrer nos seguintes níveis:

- Expressão gênica
- Compartimentalização (as enzimas ativas são alocadas no tecido segundo as necessidades fisiológicas)
- Conversão do zimogênio para sua forma ativa
- Presença de inibidores (específicos ou inespecíficos)

Dentre os inibidores inespecíficos estão a α 2-macroglobulina, o inibidor da α 1 proteinase e a α 1-quimotripsina, todos produzidos pelo fígado.

Os inibidores específicos das MMP são denominados TIMP (*Tissue Inhibitors of Metalloproteinases*) (16, 18). Até o momento foram descritos quatro TIMPS: TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 e TIMP-4, cada um com especificidade para determinadas MMP. Os TIMPS são expressos por uma variedade de tipos celulares e estão presentes na maioria dos tecidos e fluidos corpóreos.

TIMP-1 é produzido na forma solúvel, e inibe a atividade da maioria das MMP, exceto da MMP2 e da MT1-MMP. TIMP-2 também está na forma solúvel, e inibe todas as MMP, exceto a MMP9. TIMP-3, ao contrário de TIMP-1 e TIMP-2, está ligado à matriz extracelular e inibe as MMP1, 2, 3, 9 e 13.

As gelatinases (MMP2 e MMP9) são MMP com grande poder de degradação. Elas atuam em duas frentes da clivagem do colágeno. Inicialmente, atuam como collagenases, clivando parcialmente o colágeno (a MMP2 cliva o colágeno I e a MMP9 cliva os colágenos I, II e V). Posteriormente, atuam propriamente como gelatinases, clivando o produto da ação das collagenases, também denominado gelatina.

Na pele, as MMP desempenham papel em vários aspectos da biologia e patologia cutânea, por exemplo no reparo de feridas(19), doenças bolhosas (20), fibrose dérmica (21) e tumores cutâneos (22, 23).

Segundo Kähäri et al(16), as metaloproteinases atuam de maneira importante na fisiologia do desenvolvimento embriológico e na pele adulta intacta.

1.4 MMP e câncer

Sabe-se que as metaloproteinases, principalmente as gelatinases, estão envolvidas em diversas fases da oncogênese:

1.4.1 Sinalização de fatores de crescimento

A MMP9 produzida por células inflamatórias peritumorais pode ativar proteoliticamente o TGF- β , levando a aumento da invasão e metástase (24).

1.4.2 Regulação da apoptose

Há evidências de que as MMP interfiram na indução de apoptose em células malignas, processo que pode envolver a clivagem de ligantes ou de receptores que transmitem sinais pró-apoptóticos. Já é conhecida a ação da MMP7 na clivagem do Fas-ligante da superfície de células malignas tratadas com doxorrubicina (25), diminuindo o impacto da quimioterapia no tumor por bloquear a apoptose.

1.4.3 Angiogênese

Há várias evidências na literatura de que as MMP atuem de forma importante no processo de angiogênese e linfangiogênese. As MMP mais envolvidas são MMP2, MMP9 e MMP14, e, em menor escala, MMP1 e MMP7 (17).

Sabe-se que a MMP9, especialmente a secretada por neutrófilos, que não é inibida pelo TIMP-1, atua na angiogênese aumentando a

biodisponibilidade do Fator de Crescimento do Endotélio Vascular (VEGF), o mais potente indutor de proliferação vascular (26).

1.4.4 Invasão e metástase

A degradação e remodelamento da MEC, papel central exercido pelas MMP, contribuem para o processo de invasão e metástase em diversos tipos de câncer. Diversas MMP atuam nesse âmbito, como a MMP-1, -2, -13 e -14 (27). Além disso, a degradação proteolítica da membrana basal do endotélio vascular que favorece o extravasamento de células imunológicas durante processos inflamatórios pode ser crucial para o intravasamento de células tumorais na circulação (28).

1.4.5 Formação do nicho metastático

O nicho metastático é o nome dado ao local de implantação de metástases à distância, onde ocorrem diversas transformações patológicas desencadeadas pelo tumor, que tornam o microambiente favorável ao desenvolvimento das células neoplásicas.

As metaloproteinases e outras proteinases estão envolvidas de forma crucial na formação do nicho metastático. Sabe-se, por exemplo, que a MMP9 induz a liberação de VEGF, que vai estimular a angiogênese. Além disto, ela ativa o Kit-ligante, que vai recrutar as *stem cells* e células progenitoras da medula óssea (29), que desempenham papel importante na migração do tumor até o nicho.

A seguir, será feita uma breve revisão da literatura sobre cada metaloproteinase e TIMP que serão estudados no presente trabalho.

1.5 MMP2

1.5.1 MMP2 na pele normal

Na pele adulta normal, MMP2 é expressa constitutivamente por fibroblastos dérmicos e, ocasionalmente, por queratinócitos (30).

1.5.2 MMP2 nos linfomas não Hodgkin (LNH)

Há poucos estudos que avaliam a presença de MMP2 nos LNH e estes estudos ainda são conflitantes. Alguns sugerem que haja relação entre expressão de MMP2 e pior prognóstico, mas, em outros, essa correlação não é observada (31-33).

Um trabalho de 2012 (34) avaliou a presença de polimorfismo em -1306 C/T e -735 C/T, regiões promotoras do gene de MMP2. O polimorfismo em -1306 C/T leva a uma menor produção de MMP2 e -735 C/T, a uma produção aumentada. Foram analisados 575 casos de LNH. Concluiu-se que o polimorfismo em -1306 C/T foi associado a um efeito protetor, com menor risco de envolvimento de medula óssea e menor tamanho dos tumores nos pacientes que expressavam essa variação. Já o polimorfismo em -735 C/T levou a uma menor sobrevida geral, estágio mais avançado e maior tamanho dos tumores. Concluiu-se, a partir daí, que a expressão aumentada de MMP2 pode ser um fator de pior prognóstico em LNH.

No entanto, em um experimento prévio (31) foi testada expressão de MMP2 em 158 pacientes com LNH por imuno-histoquímica e hibridização *in*

situ. Não houve correlação entre a expressão de MMP2 e o estadiamento, sobrevida ou subtipo histopatológico do linfoma.

Kuittinen et al (32) discutem essa discrepância entre a maior expressão gênica de MMP2 em linfomas agressivos e a não detecção da proteína no tecido. Levantam a hipótese de que talvez a MMP2 produzida fique estocada na célula por muito tempo e, eventualmente, não seja secretada, mas sim capturada diretamente da célula produtora pelas células tumorais.

1.5.3 MMP2 nos linfomas cutâneos

Dois estudos avaliaram MMP2 em pacientes com linfomas cutâneos de células T.

Em 2010 um estudo (35) analisou se polimorfismos no gene que codifica MMP2 estaria associado a um estadiamento mais alto. O estudo, no entanto, não deixa claro se todos os casos de LCCT eram de micose fungoide ou se havia outros subtipos de linfoma no grupo. Além disto, compara a presença do polimorfismo entre estádios de LCCT e parapsoríase em grandes placas, entidade que atualmente é considerada estágio IA da micose fungoide. Encontrou-se que frequência do genótipo GGCCTT para os polimorfismos pesquisados (-1575G/A, 11306C/T e -790T/G) era maior quanto mais avançado o estágio clínico.

Um trabalho mais antigo, em 1997 (36), avalia a presença de mRNA de MMP2 e MMP9 em micose fungoide, pela técnica de hibridização *in situ*. Encontrou-se uma correlação positiva entre a expressão das duas

metaloproteinases a apresentação dermatológica em *patches*, placas ou tumores. Quanto mais avançado localmente a lesão dermatológica, maior a expressão de mRNA para MMP2 e 9.

Observou-se, ainda, que a expressão de MMP2 e de MMP9 na micose fungoide não era homogênea em toda a população celular tumoral, mas em algumas células ou em ninhos aleatoriamente distribuídos no infiltrado. Em todos os estádios, encontrou-se expressão de mRNA de MMP2 em algumas células estromais e endoteliais e fibroblastos.

1.6 TIMP-2

1.6.1 TIMP-2 na pele normal

Até o momento não há estudos que descrevam o padrão de expressão de TIMP-2 na pele normal.

1.6.2 TIMP-2 nas neoplasias hematológicas

Ao contrário de TIMP-1, que em geral é descrito como supressor tumoral, TIMP-2 apresenta um papel alternante, ora suprimindo, ora favorecendo a tumorigênese (34, 44). Um estudo de 2013 (44), que avaliou TIMP-2 em leucemias, concluiu que TIMP-2 pode tanto inibir quanto estimular MMP2. O que determinaria essa interação seria a concentração de TIMP-2. Dessa forma, baixas concentrações de TIMP-2 inibiriam MMP2 e altas concentrações a ativariam.

1.6.3 TIMP-2 nos linfomas cutâneos

Até o presente não há trabalhos que avaliem o papel de TIMP-2 nos linfomas cutâneos.

1.7 MMP9

1.7.1 MMP9 na pele normal

Na pele adulta, foi descrita produção de MMP9 por queratinócitos, sobretudo na epiderme inferior (37). Após sua produção, a enzima é estocada nos grânulos dos neutrófilos e eosinófilos. Segundo uma revisão de 1997 sobre a presença das metaloproteinases na pele (16), essa proteinase não seria produzida por fibroblastos.

1.7.2 MMP9 nos linfomas não-Hodgkin

Nos linfomas nodais a MMP9 é a metaloproteinase que parece estar mais relacionada ao prognóstico em LNH.

Um trabalho investigativo de 2003 (32) avaliou a presença de MMP9 por imuno-histoquímica em casos de LNH. A presença de MMP9 foi relacionada a pior sobrevida. Contudo, a presença de MMP9 foi fator de boa resposta a quimioterapia. Resultados semelhantes foram observados em um estudo de 2004 (31). Foi pesquisada a presença de MMP2 e MMP9 em 158 casos de pacientes com LNH por imuno-histoquímica e hibridização *in situ*. A proteína e o mRNA foram encontrados no linfoma, especialmente nas áreas periféricas do tumor e nas áreas necróticas, em macrófagos, neutrófilos e fibroblastos. MMP9 era mais expressa em linfomas T do que B, sendo os subtipos histopatológicos mais agressivos os maiores produtores. A sobrevida foi menor nos pacientes que expressavam MMP9. Nos casos de linfoma não-Hodgkin difuso de grandes células B, a quimioterapia melhorou

a sobrevida naqueles pacientes que expressavam MMP9, mas não nos que não expressavam.

Sabe-se que o estroma peritumoral é local de alta produção de MMP9 (38), sobretudo em linfomas agressivos. Nas fases mais indolentes, aparentemente a principal produção de MMP9 se dá pelas células tumorais (39).

1.7.3 MMP9 nos linfomas cutâneos

Além dos estudos de Vacca (36, 40), um estudo mais recente, de 2010 (41) analisou a presença de MMP9 em MF. Este último avaliou por imuno-histoquímica a presença da protease na epiderme e derme total de pacientes normais e com MF em diferentes apresentações dermatológicas (*patch*, placa e tumor). A expressão de MMP9 neste trabalho foi significativamente maior nos casos de MF em relação à pele normal e aumentou proporcionalmente à gravidade da doença.

1.8 TIMP-1

1.8.1 TIMP-1 na pele normal

Na pele normal, TIMP-1 é descrito nos fibroblastos dérmicos, mas não na epiderme. Glândulas sebáceas e folículos pilosos podem expressar esporadicamente TIMP-1 (37, 42).

1.8.2 TIMP-1 nos linfomas não-Hodgkin

TIMP-1 é descrito, na maioria dos trabalhos (32, 39, 43) nos LNH, desempenhando papel de supressor tumoral.

Kuittinen et al. (32) citam atividade antitumoral de TIMP-1 independente da inibição de MMP9. Ele atua na regulação de crescimento celular, na apoptose e na neovascularização. Neste trabalho, TIMP-1 esteve aumentado em tumores agressivos, mas não foi fator independente de pior prognóstico. Ao contrário, quando a MMP9 estava aumentada, o TIMP-1 aumentado era fator de melhor prognóstico.

Apesar de inibir a MMP9, notou-se que em linfomas agressivos, tanto MMP9 quanto TIMP-1 estão aumentados. Um trabalho de 1999 (39) conclui que nesses casos TIMP-1, mesmo aumentado, não é capaz de inibir satisfatoriamente a MMP9 em linfomas. Sugere-se, em tumores malignos, que possivelmente alguma molécula interfira neste processo.

1.8.3 TIMP-1 nos linfomas cutâneos

Não encontramos, até o momento, trabalhos que avaliem a expressão de TIMP-1 nos linfomas cutâneos.

2 OBJETIVOS

2.1 Principais

- Testar a hipótese de que na MFp, por ser um linfoma mais indolente, haveria menor expressão e menor atividade de MMP2 e MMP9 que na MF avançada.
- Comparar a expressão e a atividade de MMP2, MMP9, TIMP-1 e TIMP-2 entre casos de MFp, casos de MF clássica inicial, MF tumoral e em controles de pele normal, correlacionando com o grau de agressividade de cada forma da doença.

2.2 Secundários

- Fazer uma descrição epidemiológica, clínico-patológica e evolutiva dos pacientes com MFp do ambulatório de linfomas cutâneos da Divisão de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
- Descobrir se há correlação entre a apresentação clínica da MFp e suas alterações histológicas, imuno-histoquímicas e laboratoriais.

- Propor a subdivisão de pacientes com micose fungoide poiquilodérmica, segundo suas manifestações clínicas, em forma localizada, generalizada e mista.

3 MÉTODOS

3.1 Seleção dos grupos e critérios de inclusão

Foi selecionado um total de 90 indivíduos, que foram divididos em grupos (Figura 10):

- A. Grupo controle: 07 casos sem diagnóstico de micose fungoide, para análise de pele normal (PN)
- B. Micose fungoide poiquilodérmica (MFp): 54 casos
 - Micose fungoide poiquilodérmica localizada (MFpL): 25 casos
 - Micose fungoide poiquilodérmica generalizada (MFpG): 14 casos
 - Micose fungoide poiquilodérmica mista (MFpM): 15 casos
- C. Micose fungoide clássica inicial (MFi): 10 casos
- D. Micose fungoide tumoral (MFT): 19 casos
 - Micose fungoide tumoral não-transformada (MFTnt): 9 casos
 - Micose fungoide tumoral transformada (MFTt): 10 casos

Figura 1 - Desenho esquemático da casuística do trabalho e dos experimentos aos quais cada grupo foi submetido.

Legenda: AP: exame anátomo-patológico, IHQ: imuno-histoquímica. CD: marcadores de membrana de linfócitos, CD3, CD4, CD7 e CD8. MMP: metaloproteinases 2 e 9, TIMP 1 e 2. Zimo: zimografia em gelatina

3.2 Definição dos grupos e controles

- 1) A pele normal foi obtida de pacientes durante cirurgia plástica para correção de cicatriz de mastectomia por câncer de mama. A pele normal para o estudo foi retirada da mama saudável contralateral ao tumor ou do abdome das pacientes.
- 2) Os pacientes com micose fungoide clássica inicial apresentavam apenas lesões do tipo *patch* desde o início da doença e no momento da avaliação. Considerou-se transformação da micose fungoide quando 25% ou mais do infiltrado tumoral era composto por células grandes, quatro vezes ou maior que o tamanho de um linfócito normal, ou formavam nódulos microscópicos (47).

- 3) Micose fungoide poiquilodérmica foi considerada localizada quando as lesões poiquilodérmicas estavam restritas a áreas, apresentando padrão que atingia preferencialmente as regiões flexurais (Figura 2). A doença foi dita generalizada quando o paciente se encontrava eritrodérmico (Figura 3), ou seja, com o eritema associado à poiquilodermia ocupando pelo menos 80% da superfície corpórea.
- 4) Quando houve uma ou mais lesões de outra forma de MF (p.ex. *patches* ou lesões hipocrômicas, o paciente foi classificado como portador de micose fungoide poiquilodérmica mista (Figura 4).

Figura 2 - Micose fungoide poiquilodérmica localizada (MFpL). *Patch* poiquilodérmico.

Figura 3 - Micose fungoide poiquilodérmica generalizada (MFpG).
Poiquilodermia generalizada, assumindo aspecto eritrodérmico.

Figura 4 - Micose fungoide poiquilodérmica mista. Na mesma paciente notam-se áreas de poiquilodermia localizadas na região lateral da mama esquerda (seta 1) e extensa mácula hipocrômica (micose fungoide hipocromiante) na região lateral do tronco à esquerda (seta 2).

3.3 Análise epidemiológica e clínica

Foram analisados retrospectivamente todos os casos (n=54) com diagnóstico de micose fungoide poiquilodérmica atendidos na Divisão de Clínica Dermatológica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Brasil no período entre 2010 e 2014. O diagnóstico foi baseado em dados clínicos e histopatológicos.

Os pacientes foram estadiados segundo o sistema TNMB, de acordo com os critérios determinados pela *International Society for Cutaneous Lymphoma* e pela *European Organization of Research and Treatment of Cancer* (ISCL-EORTC(5) em 2007 (Tabela 1).

Consideramos como data do diagnóstico aquela em que houve confirmação de micose fungoide pelo exame histopatológico. A idade dos primeiros sintomas foi a relatada pelos pacientes.

O tempo de seguimento dos casos foi dado pelo intervalo entre a data do diagnóstico e a data da análise dos dados (01 de novembro de 2014) ou do óbito, se ocorrido antes.

Os resultados das pesquisas de clonalidade do receptor de células T (TCR – gama) na pele e no sangue foram obtidos retrospectivamente a partir de registros de prontuário.

Resposta aos tratamentos foi definida como melhora da doença cutânea (eritema, descamação, desconforto ou prurido) referida pelo médico nos dados de prontuário, após um intervalo maior ou igual a 4 meses do início da terapêutica. Consideramos falha do tratamento quando se relatou ausência de resposta após este período.

3.4 Análise histopatológica

A análise histopatológica foi feita em 24 casos de MFp (12 casos de MFpG, 12 casos de MFpL) e em todos os casos de MFi (10 casos), para avaliar as possíveis diferenças histológicas entre esses grupos.

As lâminas foram processadas e coradas com hematoxilina-eosina (HE) e coloração pela prata (Grocott).

Todas as lâminas de biópsias prévias dos pacientes foram revisadas por dermatopatologista experiente (NYSV) e pela autora deste trabalho. Para fins de análise histopatológica foram selecionadas de cada caso aquelas lâminas que apresentavam achados histopatológicos mais compatíveis com as alterações sugestivas de MF.

A análise do exame histopatológico foi padronizada segundo o sistema de gradação proposto por Guitart et al (45) (Tabela 4) para diagnóstico histológico de micose fungoide. Além disto, adicionamos uma tabela de pontuação específica que contempla critérios histológicos existentes especificamente na poiquilodermia, como degeneração vacuolar da camada basal e proliferação vascular, por exemplo (Tabela 5).

Tabela 4 - Critérios para diagnóstico histopatológico de micose fungoide (45)

CRITÉRIOS MAIORES

Densidade
0=infiltrado escasso
1=infiltrado discreto superficial perivascular
2=infiltrado moderadamente denso perivascular ou infiltrado em banda com espessamento da derme papilar
3=infiltrado denso, confluyente, com espessamento da derme papilar e envolvimento da derme reticular
Epidermotropismo
0=nenhum
1=epidermotropismo basal focal ¹ e microabscessos de Pautrier isolados ² ou poucas duplas/trios ³ ou linfócitos espalhados sem espongiose
2=epidermotropismo basal extenso e/ ou dois ou mais microabscessos de Pautrier
3=epidermotropismo extenso com mais linfócitos que queratinócitos
Atipia
0=ausente
1=discreta (células pequenas e intermediárias)
2=moderada (células atípicas pequenas, intermediárias e grandes)
3=Células uniformemente atípicas ou pleomórficas, muitas figuras de mitose, poucos linfócitos pequenos arredondados, reativos. Os linfócitos são na maioria intermediários ou grandes em tamanho
CRITÉRIOS MENORES
1=fibroplasia reticular da derme papilar ao redor de um linfócito isolado (colágeno em arame)
1 ou 2 = linfócitos atípicos primariamente intraepidérmicos ⁴
1=infiltrado linfocítico sem características inflamatórias ⁵ .

Categoria diagnóstica	Pontuação
I. Dermatite perivascular/ de interface ou outro diagnóstico específico.	0 a 2
II. Infiltrado linfocitário atípico (micose fungoide não pode ser descartada)	3 a 4
III. Infiltrado linfocitário atípico sugestivo de micose fungoide	5 a 6
IV. Micose fungoide	7 ou +

¹ Quatro ou mais linfócitos alinhados ao longo da camada basal.

² Agrupamento de quatro ou mais linfócitos com um halo claro ao redor

³ Agrupamento intraepidérmico de 2 ou 3 linfócitos

⁴ Atipia intraepidérmica. 1=baixo grau 2=alto grau

⁵ Edema da derme papilar, infiltrado inflamatório misto (eosinófilos, polimorfonucleares), espongiose OU marginação de neutrófilos com células endoteliais proeminentes.

Tabela 5 - Critérios histológicos adicionais avaliados na micose fungoide poiquilodérmica

CRITÉRIO HISTOLÓGICO	GRADAÇÃO	ANÁLISE SUBSEQUENTE
Atrofia	Ausente	
	Presente	Número de camadas da epiderme
Acantose	Ausente	
	Presente	Número de camadas da epiderme
Hiperqueratose	Ausente	
	Presente	Paraqueratósica ou ortoqueratósica? Grau 0 a 6
Degeneração vacuolar da camada basal	-	Grau 0 a 6
Queratinócitos apoptóticos	-	Grau 0 a 6
Pigmentação melânica na epiderme	-	Grau 0 a 6
Melanófagos	-	Grau 0 a 6
Proliferação vascular	-	Grau 0 a 6
Ectasia vascular	-	Grau 0 a 6

3.5 Marcação imuno-histoquímica

O estudo imuno-histoquímico foi feito para avaliar:

3.5.1 Marcadores de células T comumente pesquisados na micose fungoide: CD3, CD4, CD7 e CD8.

Esta pesquisa foi feita nos grupos de MFp (12 casos de MFpL e 12 casos de MFpG) e MFi (10 casos).

A análise foi visual e considerou a positividade para os marcadores supracitados na epiderme e na derme, numa escala de 0 a 6.

3.5.2 Metaloproteinases e seus inibidores: MMP2, TIMP-2, MMP9, TIMP-

1.

Estes marcadores foram feitos em todos os grupos (7 amostras de pele normal, 10 casos de MFi, 12 de MFpL, 12 de MFpG, 9 de MFT não-transformada e 10 de MFT transformada).

Para os estudos histopatológicos e imuno-histoquímicos, as biópsias de pele foram fixadas em solução de formaldeído a 10% tamponado em tampão fosfato, pH 7,4. Os fragmentos de tecido foram catalogados, etiquetados, colocados em caixetas plásticas perfuradas e submetidos à desidratação, diafanização e impregnação com parafina através de uma sequência de banhos em um processador automático de tecidos (Jung Histokinette 2000, Leica Instruments GmbH, Nussloch, Alemanha). Esse processo tem duração aproximada de 14 horas e consiste na imersão dos fragmentos de tecido em banhos de álcool em concentrações crescentes (50%, 70%, 96% e 100%), seguidos por um banho em solução-mistura 1:1 de álcool 100% e xilol; dois banhos em xilol puro e, por fim, dois banhos em parafina fundida a 58°C. Os fragmentos de pele foram então retirados do aparelho, incluídos em blocos de parafina e cortados em micrótomo. Os cortes histológicos (de 4 µm) foram montados em lâminas previamente silanizadas para a análise histológica e imuno-histoquímica. Os cortes foram deixados em estufa a 58°C por pelo menos 2h para a fusão da parafina e adesão dos fragmentos às lâminas.

Após breve aquecimento por 30 minutos em estufa a 60°C, as lâminas contendo os cortes de tecido com espessura de 4 µm foram desparafinizadas através de uma sequência de banhos em xilol puro, e reidratadas através de uma bateria de banhos em álcool em concentrações decrescentes e água destilada. Foi realizada a recuperação antigênica com calor úmido, em solução de ácido cítrico 10 mM tamponado, pH 6,0 em temperatura aproximada de 95°C, em panela de pressão por 5 minutos. As lâminas foram resfriadas e posteriormente mergulhadas em solução tampão TBS (Tris buffer saline), pH 7,6. Todas as incubações foram realizadas em câmara úmida a fim de evitar o ressecamento dos cortes.

Para os estudos imuno-histoquímicos, empregou-se o método da “Imunoperoxidase Indireta” através do qual foram detectados os marcadores MMP2, MMP9, TIMP-1 e TIMP-2, a partir dos seguintes anticorpos primários: Abcam polyclonal rabbit anti-MMP2 (#Ab37150), Abcam polyclonal rabbit anti-MMP9 (#Ab38898), Abcam monoclonal rabbit anti-TIMP-1 (#Ab109125) e Abcam monoclonal mouse anti-TIMP-2 (#Ab1828), respectivamente.

Após a desparafinização e a exposição dos epítomos, os cortes foram mantidos por 30 minutos em um banho contendo uma solução de Peróxido de Hidrogênio 100 volumes diluído a 30% em Álcool Metílico, protegido da luz. Essa incubação tem por finalidade bloquear a atividade da enzima peroxidase endógena dos tecidos. Após esse período, as lâminas foram enxaguadas em água destilada e mergulhadas em solução tampão TBS. Em seguida, os cortes foram incubados por mais 30 minutos com uma solução

de bloqueio (Dako Protein Block, #X0909) para evitar ligações inespecíficas do anticorpo primário.

O excesso de solução de bloqueio foi escoado das lâminas, e os cortes foram incubados por 18h, em câmara úmida, a 4°C, com os seus respectivos anticorpos primários, diluídos em solução de albumina de soro bovino (BSA) a 1% em TBS, nas seguintes diluições: MMP2 [1:1000], MMP9 [1:1000], TIMP-1 [1:50] e TIMP-2 [1:50].

No dia seguinte as lâminas foram lavadas em TBS e os cortes foram incubados por 30 minutos com uma solução de anticorpos anti-camundongo e anti-coelho associados à enzima peroxidase (Dako EnVision™+ Dual Link System-HRP AntiMouse & AntiRabbit #K4061). As lâminas foram então lavadas em TBS, reveladas com substrato cromogênico a base de Diaminobenzidina (DAB⁺, Liquid Dako #K3468) e contracoradas com Hematoxilina de Harrys.

3.6 Análise das lâminas de imuno-histoquímica

3.6.1 Anticorpos para marcadores de membrana de células T (CD3, CD4, CD7, CD8)

A análise imuno-histoquímica para estes anticorpos foi semiquantitativa e considerou a positividade para os marcadores supracitados na epiderme e na derme, numa escala de 0 a 6, sendo 0 ausência de marcação e 6 a marcação máxima dentre as lâminas avaliadas.

3.6.2 Anticorpos para MMP e TIMP

A análise das lâminas foi feita quantitativamente (por fotografias e quantificação através de *software*) para todos os grupos.

Como a marcação de TIMP-2 foi bastante heterogênea (Figura 5) entre as amostras, fizemos, adicionalmente, análise visual, numa escala de 0 a 6. Uma vez que os resultados entre a análise quantitativa e análise visual (semi-quantitativa) de TIMP-2 foram bastante diferentes, optamos por considerar apenas os resultados da análise visual.

Figura 5- Marcação para TIMP-2. Estão demonstrados dois casos do grupo MFi. Notar que a coloração de fundo predominante difere dentro de um mesmo grupo para um mesmo marcador. Esse fato fez com que optássemos pela análise semi-quantitativa para TIMP-2.

Para a análise quantitativa utilizamos o *software* Image Pro Plus 7[®] para quantificar a marcação baseada nas fotografias feitas com os *softwares* NIS Elements F[®].

O *software* Image Pro Plus 7.0[®] gera uma escala numérica baseada na intensidade da marcação da imuno-histoquímica, com base na área selecionada pelo operador (Figura 6). Escolhemos as seguintes regiões para comparação:

- Epiderme: fotografamos toda a epiderme, excluimos a camada córnea, e quantificamos sua marcação total, no aumento de 100x.
- Derme superficial: delimitamos apenas a derme papilar e quantificamos sua marcação total, no aumento de 100x. Toda a derme superior foi fotografada.
- Derme profunda: excluimos a epiderme e a derme papilar e quantificamos o restante da derme, no aumento de 100x. Neste caso, fizemos fotografias de toda a derme profunda ou de 10 campos diferentes.

Figura 6 - Método de quantificação da porcentagem da área marcada pelas MMP e TIMP com o software Image Pro Plus 7.0. A partir da área selecionada o software quantifica a porcentagem de área corada pela imuno-histoquímica em cada fotografia.

3.7 Análise de atividade de metaloproteinases – zimografia em gelatina

A análise da atividade das metaloproteinases 2 e 9 na pele foi medida pela técnica de zimografia em gelatina.

As amostras submetidas à zimografia (07 amostras de pele normal, 10 casos de MFi, 12 casos de MFpL, 8 casos de MFpG, 04 casos de MF tumoral não-transformada e 6 casos de MF tumoral transformada), um *punch* de 6 mm, foram obtidas preferencialmente de regiões não fotoexpostas. No momento da nova biópsia, os pacientes dos grupos MFi, MFpL e MFpG estavam sem tratamento havia pelo menos duas semanas. Por razões éticas, o tratamento dos pacientes do grupo com MF tumoral não foi suspenso.

Para a execução dessa técnica, procedeu-se à extração das proteínas totais do tecido cutâneo, seguida de eletroforese dessas proteínas,

incubação em solução de ativação enzimática e posterior quantificação da atividade proteolítica das metaloproteinases presentes no tecido, conforme descrito a seguir.

3.7.1 Extração de proteínas

Os fragmentos de pele foram congelados em nitrogênio líquido imediatamente após a biópsia e armazenados em *freezer* a uma temperatura de -80°C . Cada fragmento de pele congelado foi imerso em cerca de 2 ml de solução de lise e homogeneizado com auxílio de um dispersor de tecidos (IKA – Labortechnik Ultra Turrax T25 Janke&Kunkel, Alemanha). Em seguida, esse homogenato foi centrifugado durante 15 minutos a 10.000 RPM a 4°C e a concentração de proteínas no sobrenadante foi determinada pelo método colorimétrico de Bradford.

3.7.2 Eletroforese das proteínas em gel de acrilamida/gelatina e reação de digestão enzimática

Com o objetivo de separar as proteínas dos extratos proteicos obtidos de acordo com seus pesos moleculares, realizou-se uma corrida eletroforética vertical em gel de acrilamida contendo gelatina. Uma vez realizada a corrida, os géis foram mantidos por 72 horas em uma solução de ativação enzimática em temperatura aproximada de 37°C . O propósito dessa etapa é permitir que as metaloproteinases (em especial as gelatinases) presentes nos diferentes extratos proteicos consumam a gelatina presente

no gel de acrilamida, formando assim bandas “negativas” na posição correspondente a seu peso molecular.

3.7.3 Quantificação da atividade das gelatinases

Os géis foram corados com Coomassie Blue e fotografados. As bandas “negativas” formadas pela atividade das gelatinases (Figura 7) presentes nos extratos proteicos de pele foram então quantificadas com o auxílio do software IMAGE J® para processamento de imagens. Os resultados absolutos foram normalizados pelos resultados da zimografia da pele normal.

Figura 7 - Bandas negativas resultantes da digestão do gel de poliacrilamida pelas metaloproteinases 2 e 9 nas suas formas inativas (proMMP) ativas MMP.

Dessa forma foi possível quantificar não só a presença das metaloproteinases 2 e 9 (como feito pela imuno-histoquímica), mas também determinar se elas estavam ou não ativas no tecido avaliado.

3.8 Análise estatística

As variáveis contínuas foram testadas para normalidade com os testes de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro Wilk. Os valores foram expressos como medianas e percentis 25 e 75.

Os dados categóricos estão apresentados como valores absolutos e porcentagens e foram testados usando os testes de χ^2 de Pearson e o teste exato de Fisher, quando aplicável.

Os dados não paramétricos foram comparados usando o teste de Kruskal–Wallis com o pós-teste de Dwass-Steel-Christlow-Fligner. Foi considerada significância estatística quando $p \leq 0.05$.

4 RESULTADOS

4.1 Estudo dos casos de micose fungoide poiquilodérmica

4.1.1 Epidemiologia e apresentação clínica

Comparamos os grupos de MFp com os 10 casos de MFi para esta etapa do trabalho. A média de tempo seguimento após o diagnóstico foi de 8,6 anos para o grupo de MFp e 2,8 anos para o grupo MFi.

Em todos os grupos houve predomínio de pacientes do sexo feminino, com uma taxa geral de mulheres:homens = 2,44 (MFi=2, MFpG=3,66, MFpL= 1,77, MFp mista= 2). Não houve diferença estatística entre os grupos.

A média das idades dos pacientes ao diagnóstico foi, respectivamente, 54,4, 46,6, 47,9 e 46,4 anos para os grupos MFi, MFpG, MFpL e MFp mista (Figura 8). A mediana de tempo entre os primeiros sintomas e o diagnóstico foi significativamente maior em todos os grupos de MFp comparativamente ao grupo de MFi (Figura 9).

Figura 8 – Mediana de idade (anos) ao diagnóstico de micose fungoide

Figura 9 - Tempo entre os sintomas e o diagnóstico (anos)

O grupo MFpG apresentou maior incidência de lesões do tipo pitíriase liquenoide crônica (PLC) (79%) que todos os outros grupos (0% nas MF clássica, 18% na MFpL e 0% na MFp mista ($p<0,05$).

Os pacientes do grupo MFp mista apresentaram uma alta incidência de lesões hipocrômicas (10/16 casos), seguido de lesões eritemato-atróficas do tipo *patch* (4/16) e papulose linfomatoide (2/6).

Todos os pacientes do grupo MF clássica foram classificados clinicamente como estágio IA (70%) ou IB (30%). Todos os pacientes do grupo MFpG foram estágio IIIA. Os outros grupos foram divididos entre os estádios IA (20/48), IB (27/48) e IIB (1/48) (Figura 10).

Figura 10 - Distribuição da casuística de MFp segundo o estadiamento clínico.

Analisamos o tratamento dado aos pacientes de grupos de MFp e as taxas de resposta estão listadas na

Tabela 6.

Todos os grupos com MFp responderam a fototerapia (UVB-NB e PUVA). Os grupos MFpL e MFp mista também tiveram melhora com esteroides tópicos. (

Tabela 6).

	MFPG		MFPL		MF MISTA	
	Resposta (%)	Casos tratados	Resposta (%)	Casos tratados	Resposta (%)	Casos tratados
CORTICOIDE TÓPICO	33%	3	73%	14	75%	8
UVB-NB	90%	10	86%	14	90%	10
PUVA	100%	8	90%	10	80%	5

Tabela 6 - Respostas aos tratamentos para os casos de MF poiquilodérmica.

UVB-NB: fototerapia com ultravioleta B narrow band. PUVA: fototerapia com ultravioleta A e psoralênico. Rt: radioterapia.

Houve dois óbitos em toda a casuística, ambas no grupo MFpG. Um dos pacientes morreu de sepse de origem pulmonar 17 anos após o diagnóstico e, o outro, de metástases de um carcinoma espinocelular cutâneo primário, 30 anos após o diagnóstico de MF. Esse paciente havia sido submetido a múltiplos tratamentos para MF, incluindo longos períodos de fototerapia e irradiação total da pele com elétrons.

4.1.2 Histopatologia

Os pacientes dos grupos de MFp preencheram critérios histopatológicos para o diagnóstico de micose fungoide. As medianas da pontuação dos critérios de Guitart foram de 7 para MF clássica, 5.4 para MFpG e 6.3 para MFpL. (Figura 11).

Como os casos do grupo MFp mista não foram avaliados histologicamente, este grupo não foi considerado para a análise histopatológica e imuno-histoquímica.

Os grupos de MFp apresentaram uma pontuação significativamente maior do que o grupo MF clássica ($p \leq 0,05$).

Figura 11- Pontuação total para o diagnóstico histológico de micose fungoide (medianas e percentis 25 e 75). A área cinza acima da pontuação 5 representa diagnóstico sugestivo de micose fungoide pelos critérios de Guitart(45).

Os casos com poiquiloderma apresentaram as alterações histológicas típicas, tais como alterações epidérmicas (atrofia, acantose e hiperqueratose). Atrofia foi mais acentuada no grupo de MFpG ($p < 0,05$). Alterações de interface, tais como alteração vacuolar, queratinócitos

apoptóticos, presença de melanófagos e pigmentação melânica na camada basal, também foram encontradas nas lesões poiquilodérmicas de todas as formas de MFp. A redução da pigmentação melânica foi a característica mais específica de MFp comparativamente à MF clássica. Alterações vasculares (ectasia e proliferação) foram encontradas em MFp, como esperado. Proliferação vascular foi significativamente maior nos grupos MFpG e MFpL comparativamente ao grupo MF clássica ($p = 0,03$ e $p = 0,0001$).

4.1.3 Imuno-histoquímica

Os grupos de MF poiquilodérmica apresentaram uma predominância do fenótipo $CD3^+ CD4^+ CD7^- CD8^-$.

Os grupos de MFp apresentaram significativamente menor expressão de CD8 que o grupo MFi. A relação CD4/CD8 foi mais elevada nos grupos de MFp comparativamente à MF clássica (Tabela 7). Apenas 4 de 46 (8%) casos de MFp tiveram predominância de CD8 nos linfócitos intraepidérmicos, contra dois casos em 10 (20%) no grupo MF clássica (Tabela 8).

	MF_i	MFpG	MFpL
Relação CD4/CD8 na epiderme (mediana)	1,060	1,300	1,476

Relação C4/CD8 – Epiderme

Grupo 1	Grupo 2	p
MF _i	MFpG	0,0000
MF _i	MFpL	0,0000
MFpG	MFpL	0,0000

Tabela 7 - Relação CD4/CD8 (medianas) nos grupos avaliados e a significância estatística entre eles.

	Predominância CD4	Predominância CD8	Sem predominância
MFi	40% (4/10)	20% (2/10)	40% (4/10)
MFpL	50% (5/10)	20% (2/10)	30% (3/10)
MFpG	63% (7/11)	7%(1/11)	27%(3/11)

Tabela 8 – Porcentagem de casos em que há predominância dos marcadores CD4, CD8 ou nenhuma predominância na epiderme dos grupos estudados.

4.1.4 Clonalidade T

Vinte e quatro casos de MFp de um total de 62 (38,7%) foram testados para clonalidade da fração gama do TCR na pele (Tabela 9). A maioria dos casos do grupo MFpG (87,5%) foi negativa. A positividade para os grupos MFpL e MFp mista foi, respectivamente, 63,6% e 60%. Não houve diferença estatística entre esses dois últimos grupos, mas o grupo MFpG foi significativamente mais negativo que os outros grupos ($p \leq 0,05$).

		GRUPO					
		MFpG		MFpL		MFp mista	
		n	%	n	%	n	%
Clonalidade	Ausente	7	87,5%	4	36,4%	2	40,0%
	Presente	1	12,5%	7	63,6%	3	60,0%

Tabela 9 - Presença ou ausência de clonalidade do receptor de célula T medida por reação de polimerase em cadeia (PCR) em amostras de pele. A positividade foi significativamente maior em MFpL ($p=0,02$) comparativamente ao grupo MFpG

4.2 Presença e atividade das metaloproteinase e TIMP

4.2.1 Presença de MMP2 avaliada por imuno-histoquímica

A Figura 12 (abaixo) exemplifica por fotografias as marcações em cada um dos grupos estudados. A seguir, detalharemos os resultados.

Figura 12 - Marcação imuno-histoquímica para MMP2. A) pele normal. B) Micose fungoide clássica inicial. C) Micose fungoide poikilodérmica. D) Micose fungoide tumoral

4.2.1.1 Epiderme

A expressão de MMP2 na epiderme não foi diferente entre os grupos com menor agressividade clínica (MFi, MFpL e MFpG). No entanto, o grupo MFTt expressou menos MMP2 na epiderme MFpL ($p=0,027$) e MFpG e MFT transformada ($p=0,039$) (Figura 13).

Figura 13 - Representação gráfica da marcação imuno-histoquímica para MMP2 na epiderme dos grupos avaliados. * : grupos entre os quais houve significância estatística ($p \leq 0,05$).

4.2.1.2 Derme superficial

Na MFT não é possível separar a derme superficial da profunda, uma vez que ambas estão maciçamente infiltradas pelas células tumorais. Então, a derme superficial foi comparada apenas entre a pele normal e os grupos MFi, MFpG e MFpL. Não houve diferença estatística significativa entre esses três grupos (Figura 14).

Figura 14 - Representação gráfica da marcação imuno-histoquímica para MMP2 na derme superficial dos grupos avaliados. * : grupos entre os quais houve significância estatística ($p \leq 0,05$).

4.2.1.3 Derme profunda

Não houve diferença estatística na expressão de MMP2 por imuno-histoquímica entre os grupos pesquisados.

Figura 15 - Representação gráfica da marcação imuno-histoquímica para MMP2 na derme profunda dos grupos avaliados. * : grupos entre os quais houve significância estatística ($p \leq 0,05$).

4.2.2 Medição da atividade de MMP2 por zimografia em gelatina

4.2.2.1 Pro – MMP2 (enzima na forma inativa)

Não houve diferença estatística em relação à atividade da pro – MMP2 entre os grupos avaliados no nosso trabalho (Figura 16).

Figura 16 - Representação gráfica da atividade da pro MMP2 nos grupos avaliados.

4.2.2.2 MMP2 ativa

O grupo MFT transformada mostrou maior atividade de MMP2 ativa em relação a todos os outros grupos, exceto MFT não-transformada, e MFpG. O grupo MFT não-transformada, por sua vez, apresentou dados heterogêneos nesse marcador, com valores que se afastavam bastante da mediana (Figura 17).

Figura 17 - Representação gráfica da atividade forma ativa da MMP2 nos grupos avaliados. * : grupos entre os quais houve significância estatística ($p \leq 0,05$).

4.2.1 Presença de TIMP-2 avaliado por imuno-histoquímica

Na Figura 18 temos fotografias com da marcação de TIMP-2 exemplos para cada grupo estudado.

Figura 18 - Marcação imuno-histoquímica para TIMP-2. A) pele normal. B) Micose fungoide clássica inicial. C) Micose fungoide poiquilodérmica. D) e E) Micose fungoide tumoral. Observar que no caso D, como as células tumorais estão concentradas em uma região, a marcação de TIMP2 também fica mais acentuada nessa área.

4.2.1.1 Epiderme

A marcação de TIMP-2 na epiderme foi semelhante nos grupos MFi, MFpL e MFpG. Os grupos com MFT (MFTt e MFT nt), entretanto, marcaram mais TIMP-2 que os outros grupos, sem diferença entre eles.

Não houve expressão de TIMP-2 pela epiderme da pele normal (Figura 19).

Figura 19 - Representação gráfica da marcação imuno-histoquímica para TIMP-2 na epiderme dos grupos avaliados. * : grupos entre os quais houve significância estatística ($p \leq 0,05$).

4.2.1.2 Derme superficial

Não houve diferença estatística na expressão de TIMP-2 na derme superficial entre os grupos MFi, MFpL e MFpG. (Figura 20)

Figura 20 - Representação gráfica da marcação imuno-histoquímica para TIMP-2 na derme superficial dos grupos avaliados. * : grupos entre os quais houve significância estatística ($p \leq 0,05$).

4.2.1.3 Derme profunda

Os grupos MFpL, MFpG e MFi marcaram menos TIMP-2 na derme profunda nos grupos de MFT transformada e não-transformada (Figura 21). Não houve, contudo, diferença entre os dois grupos de MF tumoral ($p=0,285$).

Figura 21 - Representação gráfica da marcação imuno-histoquímica para TIMP-2 na derme profunda dos grupos avaliados. * : grupos entre os quais houve significância estatística ($p \leq 0,05$). Todos os grupos expressaram mais TIMP-2 na derme profunda que a pele normal ($p \leq 0,05$).

4.2.2 Presença de MMP9 avaliada por imuno-histoquímica

A Figura 22 (abaixo) exemplifica por fotografias as marcações em cada um dos grupos estudados. A seguir, detalharemos os resultados.

Figura 22 - Marcação imuno-histoquímica para MMP9. A) pele normal. B) Micose fungoide clássica inicial. C) Micose fungoide poiquilodérmica. D) Micose fungoide tumoral

4.2.2.1 Epiderme

MFpL e MFpG marcaram menos MMP9 na epiderme que MFi ($p=0,002$ e $0,007$, respectivamente). Não houve diferença estatística entre os grupos MFpL e MFpG.

Os grupos MFT transformada e não-transformada apresentaram também altos valores de MMP9 na epiderme. No entanto, houve diferença estatística apenas entre os grupos MFT t e MFpG (Figura 23)

Figura 23 - Representação gráfica da marcação imuno-histoquímica para MMP9 na epiderme dos grupos avaliados. * : grupos entre os quais houve significância estatística ($p \leq 0,05$).

4.2.2.2 Derme superficial.

De forma semelhante à epiderme, na derme superficial MFpL e MFpG expressaram menos MMP9 que MFi ($p=0,027$ e $0,002$, respectivamente).

Não houve diferença estatística entre os grupos MFpL e MFpG (Figura 24)

Figura 24 - Representação gráfica da marcação imuno-histoquímica para MMP9 na derme superficial dos grupos avaliados. * : grupos entre os quais houve significância estatística ($p \leq 0,05$).

4.2.2.3 Derme profunda

Na derme profunda os grupos que apresentaram menor marcação foram os MFpG e MFpL, sem diferença estatística entre os dois (Figura 25). Os grupos que tiveram mais marcação de MMP9 foram MFT, sem diferença estatística entre MFT transformada e MFT não-transformada. O grupo MFi situou-se entre os grupos MFp e MFT. O grupo MFi expressou significativamente mais MMP9 que os grupos MFpL e MFpG ($p=0,003$ e $0,05$), mas a expressão não foi estatisticamente menor que os grupos de MFT não-transformada e transformada ($p=0,34$ e $p=0,28$).

Figura 25 - Representação gráfica da marcação imuno-histoquímica para MMP9 na derme profunda dos grupos avaliados. * : grupos entre os quais houve significância estatística ($p \leq 0,05$).

4.2.3 Medição da atividade de MMP9 por zimografia em gelatina

4.2.3.1 Pro – MMP9 (enzima na forma inativa)

Não houve diferença estatística na atividade da pro – MMP9 entre os grupos avaliados no nosso trabalho (Figura 26).

Figura 26 - Representação gráfica da atividade da pro MMP9 nos grupos avaliados.

4.2.3.2 MMP9 ativa

Os grupos MFpG, MFpL, MFi e MFT t apresentaram atividade de MMP9 semelhante.

O grupo MFT não-transformada (Figura 27) apresentou mais atividade de MMP9 que todos os outros grupos, incluindo MFT transformada ($p=0,014$).

Figura 27 - Representação gráfica da atividade forma ativa da MMP9 nos grupos avaliados. * : grupos entre os quais houve significância estatística ($p \leq 0,05$).

4.2.4 Presença de TIMP-1 avaliado por imuno-histoquímica

A Figura 28 (abaixo) exemplifica por fotografias as marcações em cada um dos grupos estudados. A seguir, detalharemos os resultados.

Figura 28 - Marcação imuno-histoquímica para TIMP-1. A) pele normal. B) Micose fungoide clássica inicial. C) Micose fungoide poiquilodérmica. D) Micose fungoide tumoral

4.2.4.1 Epiderme

MFpL e MFpG expressaram TIMP-1 na epiderme de forma semelhante. MFpG, no entanto, apresentou menor expressão que MFi (Figura 29) ($p=0,047$).

MFi expressou mais TIMP1 na epiderme comparativamente às formas tumorais. Houve diferença estatística significativa entre MFi e MFTt ($p=0,043$).

Figura 29 - Representação gráfica da marcação imuno-histoquímica para TIMP-1 na epiderme dos grupos avaliados.

4.2.4.2 Derme superficial

Na derme superior (Figura 30), TIMP-1 os grupos MFpL e MFpG expressaram TIMP-1 de forma semelhante, mas ambos expressaram menos que o grupo MFi ($p=0,021$) e MFpG ($p=0,05$).

Figura 30 - Representação gráfica da marcação imuno-histoquímica para TIMP-1 na derme superficial dos grupos avaliados. * : grupos entre os quais houve significância estatística ($p \leq 0,05$).

4.2.4.3 Derme profunda

De forma análoga à derme superficial, os grupos MFpL e MFpG expressaram TIMP-1 de forma semelhante na derme profunda. Ambos os grupos expressaram menos que o grupo MFi ($p=0,03$ e $0,01$, respectivamente).

Os grupos de MFT transformada e não transformada expressaram TIMP-1 de forma semelhante, sem diferença estatística entre os outros grupos (Figura 31).

Figura 31 - Representação gráfica da marcação imuno-histoquímica para TIMP-1 na derme profunda dos grupos avaliados. * : grupos entre os quais houve significância estatística ($p \leq 0,05$).

Abaixo (Tabela 10) segue um resumo da marcação imuno-histoquímica de cada anticorpo nas camadas estudadas.

Epiderme				
	MMP2	TIMP-2	MMP9	TIMP-1
PN	+	-	+	+
MFpL	++	++	+	+
MFpG	+++	++	+	+
MFi	+++	++	+++	+++
MFT nt	+	+++	+++	+
MFT t	+	+++	+++	+
Derme Superficial				
	MMP2	TIMP-2	MMP9	TIMP-1
PN	+	+	+	+
MFpL	+++	++	+	++
MFpG	+++	++	+	++
MFi	+++	++	+++	+++
MFT nt				
MFT t				
Derme Profunda				
	MMP2	TIMP-2	MMP9	TIMP-1
PN	+	-	+	+
MFpL	+	-	+	+
MFpG	+	-	+	+
MFi	+	-	++	++
MFT nt	+	+++	+++	++
MFT t	+	+++	+++	++

Tabela 10 - Tabela comparativa das marcações imuno-histoquímicas das metaloproteínas 2 e 9 (MMP2 e MMP9) e seus inibidores, respectivamente TIMP-2 e TIMP-1. + fracamente positivo; ++ moderadamente positivo, +++ fortemente positivo

5 DISCUSSÃO

5.1 Estudo dos casos de micose fungoide poiquilodérmica – aspectos demográficos, clínico-patológicos e fenotípicos.

O presente estudo confirma que a MF poiquilodérmica é uma doença indolente. No nosso seguimento, nenhum paciente morreu pela doença. Um deles, no entanto, foi a óbito por uma neoplasia provavelmente causada por tratamentos crônicos agressivos para a MF.

Dividimos os pacientes com MF e lesões poiquilodérmicas em grupos com apresentações clínicas distintas e encontramos diferenças entre esses grupos.

Alguns autores sugerem que a condição que atualmente denominamos micose fungoide poiquilodérmica poderia corresponder a uma doença inflamatória benigna, e não a um subtipo de MF. Mahajan et al. (46) reforçam essa teoria com uma descrição de caso de poiquilodermia vascular *atrophicans* com características clínicas de MF poiquilodérmica localizada, evolução indolente e histologia com ausência de linfócitos atípicos.

Em nossa casuística, entretanto, algumas evidências refutam essa teoria: i) apesar do comportamento clínico geralmente benigno da MFp, tivemos um paciente do grupo MFp que desenvolveu lesões tumorais, com histologia típica da forma tumoral de MF. ii) em alguns dos nossos casos, em todos os grupos, foi necessário avaliar mais de uma amostra de biópsia de pele para encontrar as características histológicas típicas de MF, tais como atipia linfocitária e epidermotropismo. Acreditamos que se a biópsia for

obtida de uma região com baixa atividade da doença, a sensibilidade do exame para detecção da neoplasia pode ser baixa.

Os casos de MFpG são usualmente classificados como T4 e encaixam-se no estágio III. No entanto, o prognóstico e comportamento clínico desses casos é usualmente mais favorável que os casos de MF clássica estágio III (eritrodermia).

Embora os pacientes com MFpG tivessem biópsias de pele prévias com achados histopatológicos compatíveis com o diagnóstico de MF, houve baixa positividade para a clonalidade do receptor de célula T (12,5%). Sabemos que a MFp clinicamente cursa com surtos de atividade (eritema, descamação) e evolui para uma fase residual, com atrofia, telangectasias e alteração de pigmentação. Os resultados dos exames de clonalidade foram obtidos a partir de dados de prontuário e as biópsias de pele enviadas para esse exame não foram feitas necessariamente no mesmo local e na mesma data que a biópsia enviada para exame histopatológico. Não temos dados clínicos de como eram as lesões que foram biopsiadas para pesquisa de clonalidade T. Supomos, então, que as áreas de onde as amostras de pele foram retiradas poderiam ter pouca atividade da doença no momento do exame. Assim, haveria lesão residual, com uma quantidade pequena de linfócitos T neoplásicos, o que poderia resultar em falso negativo.

Dessa forma, diferenciar a forma generalizada da MF poiquilodérmica da forma eritrodérmica da MF clássica (T4) é importante para evitar tratamentos excessivos e para destacar esse subtipo das outras formas de MF em pesquisas e ensaios clínicos.

A concomitância de lesões hipocrômicas (MF hipocromiante ou MFh) em pacientes com MFp não está descrita em estudos prévios. Ambos subtipos de MF têm início precoce e comportamento não agressivo. São necessários mais estudos para saber se a alta prevalência de MFh em MFp é uma característica peculiar da população brasileira.

Nosso trabalho mostrou que, comparativamente ao grupo MF clássica, os pacientes com MFp tem um período mais longo entre o início dos sintomas e o diagnóstico. Esse fato sugere que a MFp seja uma doença de difícil diagnóstico para o dermatologista e para o dermatopatologista.

Todas as formas de MFp responderam satisfatoriamente às terapêuticas direcionadas à pele, como UVB-NB, PUVA e esteroides tópicos. Dado que se trata de uma doença crônica e indolente, sugerimos que seja empregado o tratamento menos agressivo possível, tais como esteroides tópicos para doença localizada e UVB-NB para casos generalizados.

A histologia da MFp reflete sua apresentação clínica. A atrofia da epiderme corresponde ao aspecto clínico denominado “em papel de cigarro”, a degeneração vacuolar com incontinência pigmentar leva à clínica de hipo e hiperpigmentação e o aumento vascular é responsável clinicamente pelas telangectasias. Como esperado, os casos de MFp apresentam características histológicas da MF clássica *patch/* placa, tais como epidermotropismo, atipia e microabscessos de Pautrier.

Até o momento só há um estudo, de 2011, que avaliou um número maior de casos de MFp (8). Ele relata uma positividade de CD8 em 15 de 40 casos de MFp (30%). Antes desse trabalho há apenas relatos de casos,

alguns deles indicando que a MFp teria uma maior tendência a positividade de CD8 em relação à MF clássica (46, 47). Os linfócitos na MFp na nossa casuística apresentaram o fenótipo CD3+, CD4+, CD7-, CD8- na epiderme e na derme na maioria dos casos. Apenas 8% dos nossos casos de MFp (4 de 46) foram predominantemente CD8+. Por não ser uma doença comum, é necessário um número maior de casos para afirmar se MFp é, de fato, uma forma de MF com tendência à maior expressão de CD8 ou se segue o mesmo padrão de positividade de CD4, como a MF clássica.

5.2 Presença e atividade das metaloproteinase e TIMP

A MMP2 parece ser um marcador de atividade para micose fungoide, ao contrário dos linfomas nodais, em que a maioria dos estudos não mostra relação entre a expressão de MMP2 e a gravidade ou prognóstico do linfoma.

Nos grupos como a MFi e a MFp, em que o epidermotropismo e a atividade de interface estão mais acentuados, em relação à pele normal houve maior expressão de MMP2 tanto na epiderme como na derme superficial.

Ao contrário do que se esperava, a imuno-histoquímica da derme profunda não mostrou maior expressão de MMP2 nos grupos em que as células neoplásicas se concentram nessa região e que tem pior prognóstico (MFT transformada e não-transformada). No entanto, a zimografia mostrou maior atividade da enzima ativa nos grupos de MFT, sobretudo MFT transformada. Propusemos duas hipóteses para essa aparente incoerência: i) a imuno-histoquímica avalia conjuntamente as formas ativa e a inativa das MMP. Vimos pela zimografia para pro-MMP2 que a fração inativa da MMP2 não é diferente entre os grupos, mas sim a ativa. Esse poderia ser um fator de confusão da análise da imuno-histoquímica. Essa, talvez, seja a razão pela qual os trabalhos prévios sobre a presença de MMP2 em LNH sejam controversos e alguns não mostrem relação entre presença de MMP2 e gravidade do LNH. ii) a avaliação da imuno-histoquímica foi feita quantitativamente. É possível que a MMP2 esteja mais expressa em algumas regiões do tumor, em detrimento de outras, por exemplo, nas áreas

de células mais atípicas. Essa variação não teria sido detectada pelo *software* da forma como as lâminas foram quantificadas.

A MMP9 mostrou-se, na literatura prévia (36, 40), a metaloproteinase que melhor se correlacionou com a gravidade de linfomas nodais da MF (32). Em nosso trabalho essa associação se manteve.

Sabe-se que na MFp e MFi a atividade tumoral está concentrada sobretudo na epiderme (epidermotropismo) e na derme superior (atividade de interface). Em nossa casuística, a marcação de MMP9 na epiderme e na derme superficial foi mais pronunciada no grupo MFi, relativamente aos grupos MFp. O grupo MFi, apesar de ser composto de pacientes que estavam numa fase inicial da micose fungoide clássica no momento da biópsia, podem ter um prognóstico potencialmente pior que os grupos de MFp, uma vez que uma parte dos pacientes de MFi devem evoluir para formas mais agressivas de MF no futuro. Podermos sugerir, dessa forma, que a expressão de MMP9 foi mais forte no grupo de pior prognóstico. No entanto, para afirmar essa hipótese, um trabalho prospectivo, que avalie o desfecho clínico de cada caso correlacionando com a atividade da MMP9 nas biópsias iniciais será mais adequado.

Os grupos MFT transformada e MFT não-transformada também apresentaram alta marcação de MMP9 na epiderme. No entanto, nesses grupos não havia epidermotropismo e atividade tumoral ou inflamatória marcada na epiderme. Havia, contudo, uma marcação intensa pelo estroma peritumoral na derme (Figura 22). Consideramos, assim, que a marcação intensa de MMP9 da epiderme nos casos de MFT deva ter ocorrido por

extravasamento a partir da derme, o que imaginamos que tenha ocorrido também com TIMP-2.

Na derme profunda, pudemos notar a melhor associação entre a MMP9 e o a gravidade da MF, uma vez que os grupos com melhor prognóstico (MFpL e MFpG) expressam menos MMP9 que o grupo de prognóstico intermediário (MFi). Esse último, por sua vez, expressa menos que os grupos de pior prognóstico (MFTt e MFTnt).

Entre os grupos de MF tumoral não houve diferença estatística significativa. No entanto, há uma tendência a uma maior expressão de MMP9 para o grupo MFT transformada, que tem pior prognóstico que o grupo MFT não-transformada. Nesse trabalho a análise das lâminas foi quantitativa. É possível que uma análise qualitativa dos casos permita observar nuances como maior expressão de MMP9 nas áreas de transformação dentro do infiltrado tumoral.

A MFT não-transformada, apesar de ser uma forma mais agressiva que os outros grupos, tem melhor prognóstico que a MFT transformada. Não era esperado, portanto, que a atividade de MMP9 fosse maior no grupo de MFTnt que em MFTt. Uma hipótese que poderia explicar essa aparente inconsistência é que os pacientes, no momento das biópsias de pele, estavam sendo submetidos a tratamentos para MF tumoral. É possível que o grupo MFT transformada, pela maior agressividade da doença, estivesse recebendo tratamentos mais agressivos, o que possivelmente reduziria a atividade de MMP9.

Não encontramos na literatura médica trabalhos que avaliassem a atividade das metaloproteinases em linfomas cutâneos. Nosso trabalho, apesar de um número limitado de casos, mostrou que a presença no tecido nem sempre reflete a atividade das enzimas.

Atualmente a comunidade científica busca marcadores moleculares que consigam prever, dentre os casos de MF, os que irão evoluir de forma desfavorável e quais permanecerão indolentes. Essa diferenciação evitaria tratamentos agressivos desnecessários ou conduziria os casos potencialmente graves a terapêuticas mais efetivas desde o início do quadro. Baseado nos estudos prévios e reforçado pelos nossos resultados, acreditamos que as metaloproteinases possam ser marcadores importantes nesse sentido. Por isto, consideramos importante que estudos maiores e prospectivos sejam realizados avaliando a presença e a atividade das MMP2 e MMP9 nas diversas apresentações de MF.

A literatura prévia sobre a descrição das MMP e TIMP na pele normal é escassa. Relatos prévios (37, 42) citam não haver TIMP-1 em condições fisiológicas na epiderme adulta. No entanto, em nosso trabalho encontramos expressão de TIMP-1 pela epiderme normal. Há, também, produção basal de TIMP-1 nas outras camadas da pele normal, o que está de acordo com o que já havia sido relatado previamente.

TIMP-1 inibe MMP9. Em estudos anteriores já foi descrito que sua presença é diretamente proporcional à de MMP9 (32). Esse padrão foi evidente também em nosso estudo. Na epiderme e na derme superior, TIMP1 foi mais expresso em MFi que nos grupos de MFp. Não houve,

contudo, extravasamento de TIMP-1 para epiderme nos casos de MF tumoral, como havia acontecido em MMP9.

Também de forma análoga à marcação de MMP9, na derme profunda, observou-se mais marcação de TIMP1 no grupo MFi que nos grupos de MFp. Apesar de as medianas dos grupos de MFT serem maiores que as dos demais grupos, não houve significância estatística. Observando a Figura 31 (página 73) , nota-se que a variabilidade da marcação dos grupos de MFT para TIMP1 é bastante grande, o que pode ter influenciado nesse resultado. Acreditamos que uma análise qualitativa desses casos seria interessante, uma vez que o anticorpo poderia estar concentrado em algumas áreas de maior agressividade do tumor. É possível que uma análise qualitativa, ou mesmo semi-quantitativa, possa vir a trazer resultados mais significativos.

TIMP-2 está intimamente relacionado à MMP2, inibindo-o ou estimulando-o, a depender da sua concentração.

No nosso estudo ele pareceu se comportar seguindo o mesmo padrão da expressão da MMP2, mas com algumas diferenças importantes. Ao contrário de MMP2, TIMP2 não é expresso pela pele normal. Sua presença, portanto, pode ser um possível marcador de uma condição patológica. Estudamos TIMP-2 apenas em casos de MF, comparando-os com a pele normal. Seria interessante comparar a expressão de TIMP-2 na epiderme de doenças inflamatórias, visando saber se há especificidade desse marcador para o diagnóstico de MF.

Houve maior expressão de TIMP-2 pelas formas tumorais de MF em relação aos outros grupos, o que não aconteceu com MMP2 na imunohistoquímica. No entanto, a atividade de MMP2 medida pela zimografia foi maior no grupo MFTnT, o que reforça nossa hipótese anterior que a forma ativa, e não total da MMP2, é que está relacionada ao prognóstico da MF.

6 CONCLUSÕES

6.1 Principais

Quanto à hipótese de que na MF poiquilodérmica, por ser um linfoma mais indolente, haveria menor expressão e menor atividade de MMP2 e MMP9 que na MF avançada, concluímos que:

a) Em relação à expressão de MMP e TIMP

A expressão não foi homogênea nos diferentes estratos da pele (epiderme, derme superficial, derme profunda) dos casos avaliados, mas correlacionou-se com o local de maior atividade linfocitária.

Apesar da maior indolência evolutiva da MF poiquilodérmica, observou-se, na epiderme, maior expressão de MMP2 na MFp que na MF tumoral.

No entanto, na derme profunda, observou-se relação entre a agressividade clínica das formas de MF e a expressão dos marcadores pesquisados, sobretudo MMP9, TIMP-1 e TIMP-2. Foi possível observar que a MF poiquilodérmica, habitualmente mais indolente que as outras formas de MF, expressou esses marcadores em menor grau que as formas tumorais (MMP9 e TIMP-2) e que a forma clássica inicial (MMP9 e TIMP-1).

b) Em relação à atividade de MMP

Houve menor atividade de MMP2 e MMP9 nas formas poiquilodérmicas em relação à forma tumoral, evidenciado pela zimografia em gelatina, o que é compatível com a menor agressividade da doença.

6.2 Secundárias

Este estudo reuniu casuística relevante de micose fungoide poiquilodérmica. Não encontramos na literatura médica outros trabalhos que analisassem os casos de acordo com sua apresentação clínica nas formas localizada, generalizada e mista.

- a) Houve diferenças entre os grupos de MF poiquilodérmica: o grupo de MFp mista apresentou alta prevalência de lesões hipocrômicas. O grupo MFpG, por sua vez, teve alta prevalência de lesões do tipo PLC e baixa positividade da pesquisa de clonalidade T nas lesões cutâneas.
- b) Consideramos importante destacar a forma generalizada da MF poiquilodérmica como um subtipo de evolução clínica diferente da forma eritrodérmica da MF clássica (estádio III). Apesar de ambas serem classificadas clinicamente com “eritrodermia”, a MFpG tem prognóstico mais indolente e deve ser abordada como tal.

7 PERSPECTIVAS FUTURAS

Nosso trabalho nos forneceu dados que darão origem a novas pesquisas:

- Descrição das MMP e TIMP na pele normal: uma vez que há pouca informação na literatura médica sobre a expressão de MMP e TIMP na pele normal, estamos desenvolvendo um artigo com a análise qualitativa das MMP e TIMP.
- Análise qualitativa das MMP e TIMP na micose fungoide: estamos descrevendo o padrão de expressão de cada MMP e TIMP nas amostras de pele dos grupos de micose fungoide do presente trabalho.
- Análise prospectiva de MMP e TIMP: neste trabalho selecionaremos os pacientes com MFT e buscaremos as biópsias de pele do início do quadro, quando ainda não tinham tumores, ou seja, quando eram MFi. O objetivo deste trabalho é avaliar a expressão de MMP e TIMP nas lesões iniciais dos pacientes do ambulatório e compará-las com casos de MFi que não evoluíram para a forma agressiva.

8 ANEXOS

Dados clínico-epidemiológicos									
CASO	GRUPO	SEXO	IDADE DX	T P/ DX	T SEGUIMENTO	PLC?	SUBT ASSOC	ESTADIO	ÓBITO
PN1	PN	F	-	-	-	-	-	-	N
PN2	PN	F	-	-	-	-	-	-	N
PN3	PN	F	-	-	-	-	-	-	N
PN4	PN	F	-	-	-	-	-	-	N
PN5	PN	F	-	-	-	-	-	-	N
PN8	PN	F	-	-	-	-	-	-	N
PN9	PN	F	-	-	-	-	-	-	N
MFi 1	MFi	M	80	1	2	N	-	IA	N
MFi 2	MFi	F	71	0	2	N	-	IB	N
MFi 3	MFi	F	64	1	2	N	-	IB	N
MFi 4	MFi	F	44	10	1	N	-	IA	N
MFi 5	MFi	F	28	2	5	N	-	IA	N
MFi 6	MFi	F	50	3	3	N	-	IA	N
MFi 7	MFi	F	57	18	5	N	-	IB	N
MFi 8	MFi	F	54	7	-	N	MFh	IA	N
MFi 9	MFi	F	43	1	1	N	-	IA	N
MFi 10	MFi	M	53	5	5	N	-	IA	N
MFp02	MFpL	F	56	3	17,5	N	LyP	IB	N
MFp03	MFpL	M	46	3	12,2	N	-	IIB	N
MFp04	MFpL	F	22	8	5,6	N	-	IA	N
MFp06	MFpL	F	61	20	2,7	N	-	IB	N
MFp08	MFpL	F	64	25	5	N	-	IB	N
MFp09	MFpL	F	24	12	4,7	N	-	IA	N
MFp11	MFpL	F	60	2	12,6	N	-	IB	N
MFp15	MFpL	M	41	30	15	N	-	IA	N
MFp17	MFpL	M	42	8	12	S	-	IB	N
MFp18	MFpL	M	12	9	7,7	N	-	IB	N
MFp19	MFpL	F	52	7	16,4	S	-	IB	N
MFp29	MFpL	M	55	3	7,2	N	-	IB	N
MFp33	MFpL	F	31	4	10,6	S	-	IB	N
MFp36	MFpL	M	38	3	4,6	N	LyP	IB	N
MFp37	MFpL	F	58	40	3,9	S	-	IB	N
MFp38	MFpL	F	46	24	18,4	N	-	IA	N
MFp41	MFpL	F	51	23	4,4	N	-	IB	N
MFp42	MFpL	M	56	5	1,4	N	-	IB	N
MFp43	MFpL	F	58	5	1,8	N	-	IB	N
MFp48	MFpL	F	48	8	5,9	N	-	IB	N
MFp50	MFpL	M	66	4	1	N	-	IB	N
MFp51	MFpL	F	33	11	4,1	N	-	IB	N
MFp52	MFpL	F	64	4	15,8	N	-	IB	N
MFp55	MFpL	F	42	5	11,8	N	-	IA	N
MFp56	MFpL	M	33	2	1	N	-	IB	N

Quadro 1- Dados clínico- epidemiológicos dos pacientes incluídos no trabalho.

DX: diagnóstico, T p/ DX: tempo para diagnóstico (anos), T SEGUIMENTO: tempo de seguimento (anos). PLC: pitíriase liquenoide crônica. Subt assoc: subtipo associado. PN: pele normal. MFi: MF clássica inicial. MFpL: micose fungoide poiquilodérmica localizada. MFpG: micose fungoide poiquilodérmica generalizada. MFT: micose fungoide tumoral. MFh: MF hipocromiante. F: feminino. M: masculino. N: não. S: sim

Dados clínico-epidemiológicos									
CASO	GRUPO	SEXO	IDADE DX	T P/ DX	T SEGUIMENTO	PLC?	SUBT ASSOC	ESTADIO	ÓBITO
MFp12	MFp mista	F	47	3	6,4	N	MFh	IA	N
MFp24	MFp mista	F	48	29	5,2	N	MFh	IB	N
MFp25	MFp mista	M	26	5	14,1	N	MFh	IA	N
MFp26	MFp mista	F	62	1	3,2	N	MFh	IB	N
MFp27	MFp mista	M	22	6	0,7	N	MFh	IA	N
MFp31	MFp mista	F	60	12	7,6	N	MFh	IA	N
MFp32	MFp mista	M	58	14	7,6	N	MF patch	IA	N
MFp34	MFp mista	F	53	20	4,1	N	MF patch	IA	N
MFp35	MFp mista	M	33	13	3,5	N	MFh	IB	N
MFp40	MFp mista	F	66	10	21,2	N	MF patch	IB	N
MFp44	MFp mista	F	40	6	1,7	N	MFh	IB	N
MFp46	MFp mista	F	35	8	5,1	N	MFh	IA	N
MFp49	MFp mista	M	71	10	1,2	N	MF patch	IA	N
MFp53	MFp mista	F	28	6	11,6	N	MFh	IB	N
MFp57	MFp mista	F	53	18	5,4	N	MFh	IA	N
MFp01	MFpG	F	42	3	17,5	N	-	IIIA	N
MFp05	MFpG	F	35	18	3,9	S	-	IIIA	N
MFp07	MFpG	M	58	3	10,6	S	-	IIIA	N
MFp10	MFpG	F	55	15	6,1	N	-	IIIA	N
MFp13	MFpG	F	48	8	8,1	S	-	IIIA	N
MFp14	MFpG	F	33	10	3,5	S	-	IIIA	N
MFp16	MFpG	F	46	11	27,8	S	-	IIIA	N
MFp20	MFpG	F	59	19	8,5	S	-	IIIA	N
MFp21	MFpG	F	53	6	3,3	S	-	IIIA	N
MFp22	MFpG	F	78	20	1,2	N	-	IIIA	N
MFp28	MFpG	M	25	12	30,7	S	-	IIIA	S
MFp39	MFpG	F	27	20	16,8	S	-	IIIA	S
MFp45	MFpG	M	50	2	9,3	S	-	IIIA	N
MFp47	MFpG	F	43	11	26,8	S	-	IIIA	N
MFT3	MFT nT	F	74	11		N	-	IIB	N
MFT4	MFT nT	M	64	1		N	-	IIB	N
MFT9	MFT nT	M	82	0		N	-	IIB	N
MFT11	MFT nT	M	64	1		N	-	IIB	N
MFT12	MFT nT	F	24	10		N	-	IIB	N
MFT13	MFT nT	M	43	0		N	-	IIB	N
MFT14	MFT nT	M	71	-		N	-	IIB	N
MFT15	MFT nT	F	71	7		N	-	IIB	N
MFT17	MFT nT	F	32	7		N	-	IIB	N
MFT1	MFT t	M	65	0		N	-	IVA1	S
MFT2	MFT t	F	44	2		N	-	IVA2	S
MFT5	MFT t	M	41	0		N	-	IIB	S
MFT6	MFT t	M	63	0		N	-	IIB	N
MFT7	MFT t	F	26	0		N	-	IIB	N
MFT8	MFT t	M	24	1		N	-	IIB	S
MFT10	MFT t	F	52	4		N	-	IVA2	S
MFT16	MFT t	F	-	-		N	-	IVA2	S
MFT18	MFT t	F	28	1		N	-	IVA2	S
MFT19	MFT t	M	-	-		N	-	IVA2	S

Continuação do quadro anterior: *Dados clínico- epidemiológicos dos pacientes incluídos no trabalho.*

DADOS DE HISTOLOGIA																	
CASO	GRUPO	Dens inflitr	Epidermotr	Atipia	Crit min			Soma atrof num	acantose (no camadas)	hiperqueratose tipo	G hiperquerat	degen vac	querat apopt	pigm epid	melanof	prolif vas	ect vas
PN1	PN	0	0	0	0			0	5	ausente	ausente	0	0	0,5	0	0	0
PN2	PN	0	0	0	0			0	6	ausente	ausente	0	0	1,5	0,5	0	0
PN3	PN	0	0	0	0			0	ausente	ausente	0	0	0	1,5	0,5	0	0
PN4	PN	0	0	0	0			0	5	ausente	ausente	0	0	1	0,5	0	0
PN5	PN	0	0	0	0			0	5	ausente	ausente	0	0	1,5	1	0	0
PN8	PN	0	0	0	0			0	ausente	ausente	0	0	0	1,5	0,5	0	0,5
PN9	PN	0	0	0	0			0	ausente	ausente	0	0	0	2	0,5	0,5	0,5
MFI 1	MFI	2	1	1	3			7	ausente	ortoqueratósica	1	0	0	1	0,5	1	0
MFI 2	MFI	2	1	1	2			6	3	ausente	ambas	0,5	0	1	0,5	1	0,5
MFI 3	MFI	1	2	1	2			6	ausente	ambas	1	0	0	2	1	0,5	0
MFI 4	MFI	1	2	2	3			8	ausente	ortoqueratósica	1	0	0	2	1	1	0,5
MFI 5	MFI	2	1	1	3			7	ausente	paraqueratósica	0,5	0	0	2,5	1	0,5	0
MFI 6	MFI	1	2	1	3			7	6	ortoqueratósica	1	0,5	0,5	2	1	0,5	0,5
MFI 7	MFI	2	1	1	3			7	ausente	ambas	1	0,5	1	1	0,5	0,5	0
MFI 8	MFI	2	2	1	3			8	ausente	ortoqueratósica	1	0	0,5	3	0,5	3	0,5
MFI 9	MFI	1	0	0	1			2	ausente	paraqueratósica	0,5	0	0	2,5	2	1	0,5
MFI 10	MFI	0	0	0	0			0	5	ausente	ausente	0	0,5	2	1	1	0,5
MFp02	MFpL	2	1	1	2			6	ausente	ambas	1	0,5	0	1,5	1,5	0,5	0,5
MFp03	MFpL	3	2	1	3			9	6	ortoqueratósica	2	1	2	3	1	0	0,5
MFp04	MFpL	2	2	1	3			8	5	ortoqueratósica	2	2	1	3	0,5	1	0,5
MFp06	MFpL	2	1	1	3			7	7	ortoqueratósica	1	2	0,5	2	1	2	1
MFp08	MFpL	0	0	0	0			0	4	ausente	0	0	2	2	2,5	2	0
MFp09	MFpL	2	1	1	3			7	3	paraqueratósica	0,5	2	2,5	2	2	1	0,5
MFp11	MFpL	1	2	1	2			6	4	ausente	0	0,5	0	2	1,5	2	0
MFp15	MFpL	2	1	1	2			6	5	ambas	1	0,5	0,5	1	0,5	2	1
MFp17	MFpL	2	3	1	3			9	5	ortoqueratósica	1	0	0	1,5	1	1	1
MFp18	MFpL	0	0	0	0			0	5	ausente	0	0	0	2	0	1	0
MFp19	MFpL	2	1	1	2			6	6	ambas	1,5	2	0,5	1,5	1,5	1	0,5
MFp29	MFpL	-	-	-	-			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MFp33	MFpL	-	-	-	-			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MFp36	MFpL	-	-	-	-			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MFp37	MFpL	-	-	-	-			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MFp38	MFpL	-	-	-	-			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MFp41	MFpL	-	-	-	-			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MFp42	MFpL	-	-	-	-			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MFp43	MFpL	-	-	-	-			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MFp48	MFpL	-	-	-	-			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MFp50	MFpL	-	-	-	-			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MFp51	MFpL	-	-	-	-			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MFp52	MFpL	-	-	-	-			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MFp55	MFpL	-	-	-	-			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MFp56	MFpL	-	-	-	-			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Quadro 2 - Dados histopatológicos dos pacientes incluídos no trabalho.

DADOS DE HISTOLOGIA																								
CASO	GRUPO	Dens infiltr	Epidermotr	Atipia	Crit min					Soma atrof num	acantose (no camadas)	hiperqueratose tipo	G hiperquerat	degen vac	querat apopt	pigm epid	melanof	prolif vas	ect vas					
MFp12	MFp mista	2	2	1	3					8	5	0		1	1	2,5	1,5	3	1					
MFp24	MFp mista	-	-	-	-					-	-	-	-	-	-	-	-	-	-					
MFp25	MFp mista	-	-	-	-					-	-	-	-	-	-	-	-	-	-					
MFp26	MFp mista	-	-	-	-					-	-	-	-	-	-	-	-	-	-					
MFp27	MFp mista	-	-	-	-					-	-	-	-	-	-	-	-	-	-					
MFp31	MFp mista	-	-	-	-					-	-	-	-	-	-	-	-	-	-					
MFp32	MFp mista	-	-	-	-					-	-	-	-	-	-	-	-	-	-					
MFp34	MFp mista	-	-	-	-					-	-	-	-	-	-	-	-	-	-					
MFp35	MFp mista	-	-	-	-					-	-	-	-	-	-	-	-	-	-					
MFp40	MFp mista	-	-	-	-					-	-	-	-	-	-	-	-	-	-					
MFp44	MFp mista	-	-	-	-					-	-	-	-	-	-	-	-	-	-					
MFp46	MFp mista	-	-	-	-					-	-	-	-	-	-	-	-	-	-					
MFp49	MFp mista	-	-	-	-					-	-	-	-	-	-	-	-	-	-					
MFp53	MFp mista	-	-	-	-					-	-	-	-	-	-	-	-	-	-					
MFp57	MFp mista	-	-	-	-					-	-	-	-	-	-	-	-	-	-					
MFp01	MFpG	2	1	1	2					6	4	10		0	2	0,5	1	2	1,5	1				
MFp05	MFpG	1	2	1	1					5	6	0		1	0,5	1	3	1	1	0				
MFp07	MFpG	2	1	0	2					5	5	0		1	0	1	1	1	1	1				
MFp10	MFpG	2	1	1	2					6	7	0		0,5	3	0,5	0,5	2	1,5					
MFp13	MFpG	1	1	1	2					5	4	0		1	0,5	2,5	1	1	1	1				
MFp14	MFpG	1	1	1	3					6	ausente	0		1	0	0,5	0,5	1	0,5					
MFp16	MFpG	1	2	1	3					7	5	0		0	0	1,5	1	1	1,5					
MFp20	MFpG	0	2	1	2					5	4	0		1	0,5	1	2	1	2	0				
MFp21	MFpG	2	1	0	1					4	4	20		1	0	0,5	0,5	0,5	1					
MFp22	MFpG	1	2	1	2					6	5	13		0,5	0,5	0	0	1	0,5					
MFp28	MFpG	-	-	-	-					-	-	-		-	-	-	-	-	-					
MFp39	MFpG	-	-	-	-					-	-	-		-	-	-	-	-	-					
MFp45	MFpG	1	2	1	2					6	ausente	16		0	0,5	0,5	1	0,5	0,5	0,5				
MFp47	MFpG	1	1	1	1					4	4	14		1	0,5	1	1	1	0,5					
MFT3	MFT nT	3	0	1	0					4	ausente	16		1	0	0	2	0,5	2	1,5				
MFT4	MFT nT	3	0	2	1					6	ausente	15		2	1	0	0,5	1	1	0,5				
MFT9	MFT nT	3	2	3	3					11	5	ausente		0	1	0	2	1	1	2				
MFT11	MFT nT	3	1	2	1					7	ausente	20		1	0	1,5	1,5	1,5	2	3				
MFT12	MFT nT	-	-	-	-					-	-	-		-	-	-	-	-	-					
MFT13	MFT nT	-	-	-	-					-	-	-		-	-	-	-	-	-					
MFT14	MFT nT	-	-	-	-					-	-	-		-	-	-	-	-	-					
MFT15	MFT nT	-	-	-	-					-	-	-		-	-	-	-	-	-					
MFT17	MFT nT	-	-	-	-					-	-	-		-	-	-	-	-	-					
MFT1	MFT t	3	1	3	2					9	ausente	17		3	0	0,5	1	1,5	1,5	1,5				
MFT2	MFT t	3	0	3	1					7	ausente	17		2	1	1	0,5	1,5	1	1,5				
MFT5	MFT t	3	1	3	1					8	ausente	10		2	1	2	1	0	0,5					
MFT6	MFT t	3	3	3	2					11	ausente	ausente		3	0	0	0,5	0,5	0,5	0,5				
MFT7	MFT t	3	1	3	1					8	5	20		1	0,5	0,5	2	1	0,5	2				
MFT8	MFT t	3	2	3	1					9	ausente	20		2,5	0	0,5	0	2	1	1				
MFT10	MFT t	3	1	2	1					7	8	ausente		1	2	0	0,5	0,5	2	1,5				
MFT16	MFT t	-	-	-	-					-	-	-		-	-	-	-	-	-					
MFT18	MFT t	-	-	-	-					-	-	-		-	-	-	-	-	-					
MFT19	MFT t	-	-	-	-					-	-	-		-	-	-	-	-	-					

Continuação do quadro anterior: *Dados clínico- histopatológicos dos pacientes incluídos no trabalho.*

		DADOS DE IMUNO-HISTOQUÍMICA							
		CD3		CD4		CD7		CD8	
CASO	GRUPO	Epid	Derme	Epid	Derme	Epid	Derme	Epid	Derme
PN1	PN	-	-	-	-	-	-	-	-
PN2	PN	-	-	-	-	-	-	-	-
PN3	PN	-	-	-	-	-	-	-	-
PN4	PN	-	-	-	-	-	-	-	-
PN5	PN	-	-	-	-	-	-	-	-
PN8	PN	-	-	-	-	-	-	-	-
PN9	PN	-	-	-	-	-	-	-	-
Mediana									
MF1 1	MF1	0,5	1,5	0,5	1,5	0	0,5	0	1,5
MF1 2	MF1	1	1	1	1	0,5	0,5	0,5	0,5
MF1 3	MF1	1	1	1	1	0,5	0,5	0,5	0,5
MF1 4	MF1	1	0,5	0,5	0,5	0	0,5	1	0,5
MF1 5	MF1	0,5	1,5	0	1	0	0,5	0,5	1
MF1 6	MF1	1	1,5	0,5	1	0,5	0,5	0,5	0,5
MF1 7	MF1	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0	0,5
MF1 8	MF1	1	1	1	1	0	0,5	1	1
MF1 9	MF1	0,5	1	0	0,5	0	0,5	0	0,5
MF1 10	MF1	0,5	0,5	0,5	0,5	0	0	0,5	0,5
Mediana		0,8	1,0	0,5	1,0	0,0	0,5	0,5	0,5
MFp02	MFpL	0,5	1	1	2	0	0,5	0,5	0,5
MFp03	MFpL	1	2	1	2	0	0,5	0	0,5
MFp04	MFpL	0,5	1	0,5	1	0,5	0,5	0,5	1
MFp06	MFpL	0,5	2	0,5	2	0	0	0	1
MFp08	MFpL	0	1	0	0,5	0	0	0	0,5
MFp09	MFpL	0,5	1	0,5	1	0	0	0,5	0,5
MFp11	MFpL	0,5	0,5	0,5	0,5	0	0	0	0
MFp15	MFpL	1	2	0,5	1,5	0	1	0	1,5
MFp17	MFpL	1	1	0,5	1	0	1	1	1
MFp18	MFpL	0	0,5	0	0,5	0	0	0,5	1,5
MFp19	MFpL	1	1	0,5	1	0	0	0,5	0,5
MFp29	MFpL	-	-	-	-	-	-	-	-
MFp33	MFpL	-	-	-	-	-	-	-	-
MFp36	MFpL	-	-	-	-	-	-	-	-
MFp37	MFpL	-	-	-	-	-	-	-	-
MFp38	MFpL	-	-	-	-	-	-	-	-
MFp41	MFpL	-	-	-	-	-	-	-	-
MFp42	MFpL	-	-	-	-	-	-	-	-
MFp43	MFpL	-	-	-	-	-	-	-	-
MFp48	MFpL	-	-	-	-	-	-	-	-
MFp50	MFpL	-	-	-	-	-	-	-	-
MFp51	MFpL	-	-	-	-	-	-	-	-
MFp52	MFpL	-	-	-	-	-	-	-	-
MFp55	MFpL	-	-	-	-	-	-	-	-
MFp56	MFpL	-	-	-	-	-	-	-	-
Mediana		0,5	1,0	0,5	1,0	0,0	0,0	0,5	0,5

Quadro 3 - Dados de imuno-histoquímica para CD3, CD4, CD7 e CD8 dos pacientes incluídos no trabalho

		DADOS DE IMUNO-HISTOQUÍMICA							
		CD3		CD4		CD7		CD8	
MFp12	MFp mista	1	1,5	1	1,5	0	0,5	0,5	1
MFp24	MFp mista	-	-	-	-	-	-	-	-
MFp25	MFp mista	-	-	-	-	-	-	-	-
MFp26	MFp mista	-	-	-	-	-	-	-	-
MFp27	MFp mista	-	-	-	-	-	-	-	-
MFp31	MFp mista	-	-	-	-	-	-	-	-
MFp32	MFp mista	-	-	-	-	-	-	-	-
MFp34	MFp mista	-	-	-	-	-	-	-	-
MFp35	MFp mista	-	-	-	-	-	-	-	-
MFp40	MFp mista	-	-	-	-	-	-	-	-
MFp44	MFp mista	-	-	-	-	-	-	-	-
MFp46	MFp mista	-	-	-	-	-	-	-	-
MFp49	MFp mista	-	-	-	-	-	-	-	-
MFp53	MFp mista	-	-	-	-	-	-	-	-
MFp57	MFp mista	-	-	-	-	-	-	-	-
Mediana									
MFp01	MFpG	0,5	2	0,5	1,5	0	0	0,5	1
MFp05	MFpG	0,5	1	0,5	1	0	0,5	0	0,5
MFp07	MFpG	0,5	2	0,5	2	0	0	0,5	1,5
MFp10	MFpG	0,5	2	0,5	1,5	0	1	0	1
MFp13	MFpG	0,5	0,5	0,5	0,5	0	0,5	0	0,5
MFp14	MFpG	1	0,5	0,5	0,5	0	0,5	0,5	0,5
MFp16	MFpG	0	0,5	0	0,5	0	0,5	0	0
MFp20	MFpG	0,5	1	0,5	1	0	0,5	0	0,5
MFp21	MFpG	1	1,5	1	1	0,5	0,5	0,5	0,5
MFp22	MFpG	1	1,5	1	1,5	0,5	1	0	0,5
MFp28	MFpG	-	-	-	-	-	-	-	-
MFp39	MFpG	-	-	-	-	-	-	-	-
MFp45	MFpG	1,5	0,5	0,5	0,5	1	0,5	1	0,5
MFp47	MFpG	0,5	1	0,5	1	0	0	0	0,5
Mediana		0,5	1,0	0,5	1,0	0,0	0,5	0,0	0,5
MFT3	MFT nT	-	-	-	-	-	-	-	-
MFT4	MFT nT	-	-	-	-	-	-	-	-
MFT9	MFT nT	-	-	-	-	-	-	-	-
MFT11	MFT nT	-	-	-	-	-	-	-	-
MFT12	MFT nT	-	-	-	-	-	-	-	-
MFT13	MFT nT	-	-	-	-	-	-	-	-
MFT14	MFT nT	-	-	-	-	-	-	-	-
MFT15	MFT nT	-	-	-	-	-	-	-	-
MFT17	MFT nT	-	-	-	-	-	-	-	-
Mediana									
MFT1	MFT t	-	-	-	-	-	-	-	-
MFT2	MFT t	-	-	-	-	-	-	-	-
MFT5	MFT t	-	-	-	-	-	-	-	-
MFT6	MFT t	-	-	-	-	-	-	-	-
MFT7	MFT t	-	-	-	-	-	-	-	-
MFT8	MFT t	-	-	-	-	-	-	-	-
MFT10	MFT t	-	-	-	-	-	-	-	-
MFT16	MFT t	-	-	-	-	-	-	-	-
MFT18	MFT t	-	-	-	-	-	-	-	-
MFT19	MFT t	-	-	-	-	-	-	-	-
Mediana									

Continuação do quadro anterior: *Dados de imuno-histoquímica para CD3, CD4, CD7 e CD8 dos pacientes incluídos no trabalho.*

		IMUNO-HISTOQUÍMICA										DADOS DE ZIMOGRAFIA							
		MMP2			MMP9			TIMP-1				TIMP-2		MMP2			MMP9		
GRUPO		Epid	DERME SUP	DERME PROF	Epid	DER SUP	DER PROF	Epid	DER SUP	DER PROF	Epid	DER SUP	DER PROF	PRO	ATIVA	PRO	ATIVA		
CASO																			
PN1	Pele normal	21,4	6,6	4,1	45,2	41,2	35,9	9,2	9,5	10,0	0,0	0,0	0,0	0,7	0,4	0,5	0,5		
PN2	Pele normal	7,3	7,0	8,5	43,2	67,5	43,2	7,0	8,5	6,7	0,0	1,0	0,0	1,3	1,6	1,0	1,0		
PN3	Pele normal	12,8	4,0	6,4	48,1	50,9	34,5	26,9	17,2	11,9	0,0	0,5	0,0	1,0	1,0	1,0	1,0		
PN4	Pele normal	10,4	6,3	5,4	54,5	43,3	46,0	23,2	8,2	7,5	0,0	0,5	0,0	1,0	1,4	1,0	1,0		
PN5	Pele normal	27,1	6,4	9,9	57,7	51,6	55,9	14,0	11,7	12,6	0,0	1,0	0,5	1,0	0,6	0,6	0,6		
PN8	Pele normal	73,2	15,3	9,9	35,5	45,6	45,1	13,7	19,3	21,4	0,0	0,5	0,0	-	-	1,4	1,4		
PN9	Pele normal	28,8	13,0	4,1	24,8	49,7	41,0	9,3	16,9	29,2	0,0	0,5	0,5	-	-	1,5	1,5		
Mediana		21,4	6,6	6,4	45,2	49,7	43,2	13,7	11,7	11,9	0,0	0,5	0,0	1,0	1,0	1,0	1,0		
MFI 1	MF inicial	18,7	9,9	9,4	32,6	54,8	42,1	19,3	36,5	9,4	1,0	2,0	0,0	-	-	-	-		
MFI 2	MF inicial	25,2	19,1	11,9	69,0	40,9	39,6	48,7	43,3	30,2	0,0	1,5	0,0	0,6	0,4	0,5	1,4		
MFI 3	MF inicial	13,5	21,1	12,7	63,3	68,5	44,0	38,2	34,6	10,7	1,0	1,5	0,0	0,7	0,5	1,0	1,0		
MFI 4	MF inicial	13,5	9,4	6,7	48,0	79,4	45,1	24,9	35,8	24,1	0,0	0,5	0,0	0,6	0,3	0,6	1,1		
MFI 5	MF inicial	18,5	21,9	14,8	32,0	69,5	35,5	18,7	49,4	24,1	0,5	2,5	0,0	1,5	1,9	0,9	1,2		
MFI 6	MF inicial	8,0	8,2	3,3	77,8	79,7	61,9	50,7	36,2	14,9	0,5	0,5	0,0	0,9	0,9	0,5	0,8		
MFI 7	MF inicial	47,1	20,9	7,7	97,8	92,9	76,5	73,3	40,7	22,2	0,0	2,0	0,0	1,0	0,8	2,1	1,8		
MFI 8	MF inicial	29,2	17,4	12,2	98,7	98,3	79,6	28,7	36,4	33,1	0,0	0,5	0,0	1,7	1,3	2,0	1,0		
MFI 9	MF inicial	11,9	16,3	9,5	73,4	80,2	61,1	14,8	30,3	27,8	0,0	1,0	0,0	0,8	0,1	0,9	0,5		
MFI 10	MF inicial	-	-	-	69,3	71,4	35,0	5,8	19,3	17,5	0,0	0,5	0,0	2,2	1,6	0,7	0,6		
Mediana		18,5	17,4	9,5	69,2	75,4	44,5	26,8	36,3	23,1	0,0	1,3	0,0	0,9	0,8	0,9	1,0		
MFp02	MFp Localizada	56,1	17,0	9,4	61,6	64,3	59,9	2,0	5,0	9,6	0,0	0,5	0,0	0,6	0,5	0,5	0,9		
MFp03	MFp Localizada	14,5	21,0	8,9	24,2	53,3	25,7	17,4	28,6	6,2	0,0	2,0	-	0,5	0,5	0,6	1,3		
MFp04	MFp Localizada	16,6	17,1	13,9	30,8	38,8	15,2	35,2	53,5	25,0	0,0	1,0	0,0	2,1	1,6	2,2	1,7		
MFp06	MFp Localizada	14,1	11,3	5,8	24,2	43,4	20,3	32,6	41,4	14,4	1,0	2,0	0,0	1,1	1,0	1,0	1,0		
MFp08	MFp Localizada	3,4	7,1	5,9	2,2	7,4	17,0	0,5	2,6	12,5	0,0	0,5	0,0	0,7	0,7	1,0	1,0		
MFp09	MFp Localizada	19,9	13,0	8,5	13,8	45,7	33,3	25,4	35,7	16,7	0,0	1,0	0,0	1,7	1,3	1,3	2,3		
MFp11	MFp Localizada	13,1	10,7	6,0	17,0	22,4	10,5	26,7	12,9	12,9	0,0	0,5	0,0	3,1	1,7	1,1	0,8		
MFp15	MFp Localizada	81,9	28,8	9,5	7,3	30,5	15,1	14,0	19,8	4,7	0,5	2,0	0,0	1,5	0,9	1,5	0,9		
MFp17	MFp Localizada	12,5	17,3	7,4	22,8	52,8	30,1	7,3	27,1	19,9	0,5	2,0	0,0	1,5	1,4	1,5	1,0		
MFp18	MFp Localizada	80,0	28,9	11,3	74,6	65,8	52,6	22,4	25,9	8,3	0,5	1,5	0,0	1,7	1,3	1,1	0,8		
MFp19	MFp Localizada	-	-	-	-	-	-	32,1	16,5	4,4	0,5	1,5	0,0	-	-	4,5	3,0		
MFp29	MFp Localizada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
MFp33	MFp Localizada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
MFp36	MFp Localizada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
MFp37	MFp Localizada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
MFp38	MFp Localizada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
MFp41	MFp Localizada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
MFp42	MFp Localizada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
MFp43	MFp Localizada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
MFp48	MFp Localizada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
MFp50	MFp Localizada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
MFp51	MFp Localizada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
MFp52	MFp Localizada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
MFp55	MFp Localizada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
MFp56	MFp Localizada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Mediana		15,5	17,1	8,7	23,5	44,6	23,0	22,4	25,9	12,5	0,0	1,5	0,0	1,5	1,1	1,1	1,0		

Quadro 4 - Dados de zimografia e de imuno-histoquímica para MMP e TIMP dos pacientes incluídos no trabalho

CASO	GRUPO	IMUNO-HISTOQUÍMICA										DADOS DE ZIMOGRAFIA							
		MMP2		MMP9		TIMP-1		TIMP-2		MMP2		MMP9							
		EpId	DERME PROF	EpId	DER SUP	DER PROF	EpId	DER SUP	DER PROF	EpId	DER SUP	DER PROF	EpId	DER SUP	DER PROF	PRO	ATIVA		
MFP12	MFP nista	20,6	14,1	12,1	-	29,1	47,2	35,5	22,8	35,6	18,5	0,5	2,0	0,0	1,0	0,8	0,5	1,0	
MFP24	MFP nista	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
MFP25	MFP nista	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
MFP26	MFP nista	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
MFP27	MFP nista	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
MFP31	MFP nista	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
MFP32	MFP nista	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
MFP34	MFP nista	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
MFP35	MFP nista	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
MFP40	MFP nista	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
MFP44	MFP nista	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
MFP46	MFP nista	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
MFP49	MFP nista	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
MFP53	MFP nista	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
MFP57	MFP nista	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Mediana																			
MFP01	MFP Generalizada	21,3	30,0	9,3	59,6	45,7	40,5	9,1	18,1	14,1	0,5	1,0	0,5	1,4	0,4	1,0	1,0	1,1	
MFP05	MFP Generalizada	20,4	16,4	3,0	21,6	29,8	18,8	18,7	23,7	10,2	0,5	1,0	0,0	1,3	1,1	0,7	0,9	0,9	
MFP07	MFP Generalizada	18,5	18,2	9,5	12,5	36,3	14,9	11,2	40,9	10,5	0,0	2,0	0,0	1,0	1,1	1,0	1,1	1,1	
MFP10	MFP Generalizada	80,8	52,8	20,8	49,3	77,5	66,8	2,2	26,2	6,5	0,0	2,0	0,0	1,4	0,9	1,6	1,2	1,2	
MFP13	MFP Generalizada	27,1	15,1	13,5	12,6	41,2	34,7	49,2	21,8	14,2	0,5	0,5	0,0	-	-	-	-	-	
MFP14	MFP Generalizada	47,9	23,8	7,2	59,1	79,4	68,3	11,0	18,6	6,2	0,5	0,5	0,0	1,7	1,1	1,9	1,4	1,4	
MFP16	MFP Generalizada	35,0	17,8	12,3	46,1	55,6	34,3	16,2	20,3	17,8	0,5	1,0	0,0	2,4	1,9	0,7	0,7	0,7	
MFP20	MFP Generalizada	24,8	15,8	7,2	46,5	50,2	33,9	10,8	13,0	8,2	0,0	1,0	0,0	1,3	0,8	1,3	1,0	1,0	
MFP21	MFP Generalizada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
MFP22	MFP Generalizada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
MFP28	MFP Generalizada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
MFP39	MFP Generalizada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
MFP45	MFP Generalizada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
MFP47	MFP Generalizada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Mediana		25,9	18,0	9,4	46,3	47,9	34,6	11,1	21,0	10,4	0,5	1,0	0,0	1,4	1,1	1,0	1,1	1,1	
MFT3	MFT não transformada	6,4	2,3	4,9	49,4	36,8	34,0	29,9	13,5	26,2	0,5	-	3,0	0,8	0,8	1,1	1,1	1,1	
MFT4	MFT não transformada	10,4	15,2	17,7	68,6	72,3	56,0	2,1	37,3	20,3	1,0	-	1,5	2,6	3,5	1,0	1,6	1,6	
MFT9	MFT não transformada	35,7	13,3	6,6	91,5	93,4	87,7	0,9	0,4	1,0	1,5	-	3,0	0,8	1,0	2,3	1,7	1,7	
MFT11	MFT não transformada	2,1	6,0	7,5	2,3	7,6	24,5	2,2	8,5	6,9	2,0	-	2,0	1,0	1,1	1,8	1,5	1,5	
MFT12	MFT não transformada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
MFT13	MFT não transformada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
MFT14	MFT não transformada	62,6	51,4	75,5	60,5	60,7	56,1	23,3	29,8	34,8	-	-	-	-	-	-	-	-	
MFT15	MFT não transformada	-	-	-	2,0	9,1	10,2	39,7	42,7	33,5	-	-	-	-	-	-	-	-	
MFT17	MFT não transformada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Mediana		10,4	13,3	7,5	55,0	48,7	45,0	12,7	21,6	23,2	1,25	-	2,5	0,9	1,1	1,4	1,5	1,5	
MFT1	MFT transformada	9,4	10,4	10,8	70,3	67,0	71,3	19,9	10,4	10,6	0,5	-	2,5	1,3	2,0	1,1	1,1	1,1	
MFT2	MFT transformada	6,1	14,5	9,6	60,8	62,1	63,4	15,5	19,7	18,3	0,5	-	4,0	3,8	2,3	-	-	-	
MFT5	MFT transformada	11,3	7,7	3,7	65,2	70,9	73,0	23,4	52,0	36,6	1,5	-	3,5	0,9	0,9	0,3	0,6	0,6	
MFT6	MFT transformada	28,9	25,8	5,3	-	-	85,0	-	61,0	-	-	-	3,0	-	-	-	1,0	0,7	
MFT7	MFT transformada	2,4	1,8	1,1	56,6	35,0	40,6	8,8	4,7	1,8	2,0	-	3,0	2,7	1,7	2,0	1,0	1,0	
MFT8	MFT transformada	0,7	1,8	1,6	88,4	93,0	75,6	1,7	1,3	0,5	1,0	-	2,5	1,6	2,1	1,4	1,0	1,0	
MFT10	MFT transformada	2,9	9,7	8,8	63,9	82,2	66,1	7,2	9,9	3,6	0,0	-	2,0	-	-	-	-	-	
MFT16	MFT transformada	36,1	36,4	31,2	31,3	70,4	59,8	25,5	29,8	27,2	-	-	-	-	-	-	-	-	
MFT18	MFT transformada	-	-	-	30,2	82,6	68,9	9,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
MFT19	MFT transformada	-	-	-	3,9	31,4	21,8	20,3	54,7	51,5	-	-	-	-	-	-	-	-	
Mediana		7,8	10,1	7,0	60,8	70,4	67,5	15,5	15,1	18,3	0,8	-	3,0	1,6	2,0	1,1	1,0	1,0	

Continuação do quadro anterior: *Dados de zimografia e de imuno-histoquímica para MMP e TIMP dos pacientes incluídos no trabalho.*

	PN			MFI			MFpG			MFpL			MFT nt			MFT t		
	Med	P25	P75	Med	P25	P75	Med	P25	P75	Med	P25	P75	Med	P25	P75	Med	P25	P75
IHQ MMP2 EPID	21,38	10,39	28,78	16,14	12,71	27,19	25,92	20,86	41,47	16,61	13,14	56,10	10,44	6,36	35,71	7,79	2,68	20,13
IHQ MMP2 DERM SUP	6,58	6,29	13,02	16,86	9,63	19,98	18,01	16,09	26,91	17,00	11,28	21,02	13,32	6,03	15,23	10,06	4,72	20,18
IHQ MMP2 DERM PROF	6,44	4,15	9,93	9,45	7,19	12,04	9,42	7,17	12,94	8,94	6,01	11,34	7,48	6,61	17,69	7,04	2,65	10,20
ZIMO PRO MMP2	1,00	0,97	1,03	0,85	0,67	1,35	1,35	1,29	1,70	1,47	0,74	1,71	0,93	0,84	1,79	1,61	1,32	2,74
ZIMO MMP2 ATIVA	1,00	0,58	1,42	0,66	0,34	1,11	1,05	0,82	1,13	0,95	0,65	1,41	1,05	0,93	2,29	1,96	1,73	2,08
IHQ MMP9 EPID	45,21	35,45	54,51	69,28	63,26	77,83	48,27	17,11	54,20	24,15	13,79	30,76	54,96	2,35	68,63	60,82	31,29	65,17
IHQ MMP9 DERM SUP	49,72	43,30	51,59	79,41	68,46	80,17	47,95	38,74	66,55	45,73	30,51	53,28	48,72	9,11	72,31	70,36	62,13	82,16
IHQ MMP9 DERM PROF	43,21	35,91	45,96	45,06	42,05	61,90	34,61	26,37	53,65	25,65	15,18	35,53	44,96	24,47	56,05	67,47	59,78	73,00
ZIMO PRO MMP9	1,00	0,60	1,40	0,83	0,55	1,52	1,02	0,70	1,60	1,12	0,80	1,50	1,43	1,04	2,06	1,05	1,00	1,44
ZIMO MMP9 ATIVA	1,00	0,60	1,40	0,98	0,69	1,25	1,05	0,90	1,22	1,01	0,89	1,49	1,53	1,30	1,65	1,01	0,70	1,03
IHQ TIMP1 EPID	13,72	9,21	23,21	28,65	19,32	48,72	11,12	9,97	17,48	22,58	10,67	29,41	12,72	2,11	29,88	15,52	8,82	20,32
IHQ TIMP1 DERM SUP	11,72	8,52	17,18	36,21	34,57	36,46	21,05	18,39	24,98	26,52	14,71	35,64	21,64	8,48	37,28	15,07	7,30	40,90
IHQ TIMP1 DERM PROF	11,85	7,48	21,36	22,19	14,86	27,80	10,37	7,31	14,15	12,69	7,22	17,62	23,23	6,89	33,47	18,29	3,64	36,63
IHQ TIMP2 EPIDERM	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,50	0,50	0,00	0,50	0,25	0,00	0,50	1,25	0,75	1,75	0,75	0,50	1,50
IHQ TIMP2 DERM SUP	0,50	0,50	1,00	1,00	0,50	1,50	1,00	0,75	1,50	1,50	0,75	2,00						
IHQ TIMP2 DERM PROF	0,00	0,00	0,50	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,50	1,75	3,00	3,00	2,50	3,50
IHQ MMP2 EPID	MFI X MFpG	MFI X MFpL	MFI X PN	MFI X MFT t	MFI X MFpG X MFpL	MFI X MFpG X MFT nt	MFI X MFpG X MFT t	MFI X MFpG X PN	MFI X MFpL X MFT t	MFI X MFpL X PN	MFI X MFT nt X PN	MFI X MFT t X PN	MFI X MFT nt X PN	MFI X MFT t X PN	MFI X MFT t X PN	MFI X MFT t X PN	MFI X MFT t X PN	MFI X MFT t X PN
IHQ MMP2 DERM SUP	0,093	0,620	0,558	0,074	1,000	0,117	0,306	0,355	0,336	0,336	0,336	0,336	0,336	0,336	0,336	0,336	0,336	0,336
IHQ MMP2 DERM PROF	0,208	0,804	0,380	0,401	0,011	0,137	0,079	0,046	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002
ZIMO PRO MMP2	0,834	0,620	1,000	0,345	0,203	0,563	1,000	0,345	0,203	0,345	0,203	0,345	0,203	0,345	0,203	0,345	0,203	0,345
ZIMO MMP2 ATIVA	0,064	0,409	0,308	0,079	0,464	0,751	0,257	0,465	0,028	0,794	0,336	0,336	0,336	0,336	0,336	0,336	0,336	0,336
IHQ MMP9 EPID	0,203	0,117	0,174	0,013	0,306	0,964	0,850	0,062	0,808	0,514	0,020	0,020	0,020	0,020	0,020	0,020	0,020	0,020
IHQ MMP9 DERM SUP	0,007	0,002	0,126	0,102	0,017	0,457	0,439	0,124	0,908	0,482	0,037	0,042	0,037	0,042	0,037	0,042	0,037	0,042
IHQ MMP9 DERM PROF	0,027	0,002	0,126	0,453	0,013	0,509	0,796	0,178	0,908	0,763	0,017	0,017	0,017	0,017	0,017	0,017	0,017	0,017
ZIMO PRO MMP9	0,054	0,003	0,346	0,288	0,266	0,186	0,897	0,021	0,203	0,269	0,001	0,026	0,001	0,026	0,001	0,026	0,001	0,026
ZIMO MMP9 ATIVA	0,354	0,296	0,126	0,660	0,862	1,000	0,345	0,935	0,277	0,467	0,752	0,422	0,389	0,107	0,515	0,389	0,107	0,515
IHQ TIMP1 EPID	0,563	0,487	0,062	1,000	0,862	0,833	0,023	0,223	0,482	0,146	0,399	0,526	0,014	0,038	0,871	0,014	0,038	0,871
IHQ TIMP1 DERM SUP	0,043	0,136	0,126	0,047	0,039	0,316	0,796	1,000	0,908	0,779	0,256	0,353	1,000	0,886	0,874	1,000	0,886	0,874
IHQ TIMP1 DERM PROF	0,021	0,055	0,195	0,124	0,897	0,643	0,897	0,529	0,008	0,851	0,537	0,063	0,897	0,475	0,487	0,897	0,475	0,487
IHQ TIMP2 EPIDERM	0,012	0,033	0,906	0,825	0,101	0,643	0,197	0,386	0,563	0,190	0,570	0,080	0,906	0,475	0,711	0,906	0,475	0,711
IHQ TIMP2 DERM SUP	0,556	0,719	0,018	0,060	0,102	0,761	0,014	0,081	0,013	0,010	0,062	0,029	0,046	0,002	0,004	0,046	0,002	0,004
IHQ TIMP2 DERM PROF	0,841	0,335			0,099	0,420		0,448	0,453	0,453	0,453	0,453	0,453	0,453	0,453	0,453	0,453	0,453
IHQ TIMP2 DERM PROF	0,289	1,000	<0,0001	<0,0001	0,097	0,241	0,002	<0,0001	0,453	0,453	<0,0001	0,068	0,285	0,005	0,001	0,285	0,005	0,001

Quadro 5 – Acima: Medianas e percentis das marcações imuno-histoquímicas para MMP e TIMP e para zimografia para MMP2 e MMP9. Abaixo: significâncias estatísticas entre os grupos. IHQ: imuno-histoquímica, MMP: metaloproteinase, EPID: epiderme, SUP: superior, PROF: profunda, ZIMO: zimografia, Med: mediana, P25: percentil 25, P75: percentil 75.

9 REFERÊNCIAS

1. Willemze R, Jaffe ES, Burg G, Cerroni L, Berti E, Swerdlow SH, et al. WHO-EORTC classification for cutaneous lymphomas. *Blood*. 2005;105(10):3768-85.
2. Sanches J, Moricz C, Neto C. Lymphoproliferative processes of the skin. Part 2 - Cutaneous T-cell and NK-cell lymphomas. *An Bras Dermatol*. 2006;81(1):7.
3. Olsen EA, Rook AH, Zic J, Kim Y, Porcu P, Querfeld C, et al. Sézary syndrome: immunopathogenesis, literature review of therapeutic options, and recommendations for therapy by the United States Cutaneous Lymphoma Consortium (USCLC). *J Am Acad Dermatol*. 2011;64(2):352-404.
4. Olsen EA, Whittaker S, Kim YH, Duvic M, Prince HM, Lessin SR, et al. Clinical end points and response criteria in mycosis fungoides and Sézary syndrome: a consensus statement of the International Society for Cutaneous Lymphomas, the United States Cutaneous Lymphoma Consortium, and the Cutaneous Lymphoma Task Force of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer. *J Clin Oncol*. 2011;29(18):2598-607.
5. Olsen E, Vonderheid E, Pimpinelli N, Willemze R, Kim Y, Knobler R, et al. Revisions to the staging and classification of mycosis fungoides and Sezary syndrome: a proposal of the International Society for Cutaneous Lymphomas (ISCL) and the cutaneous lymphoma task force of the European Organization of Research and Treatment of Cancer (EORTC). *Blood*. 2007;110(6):1713-22.

6. Cerroni L. Lymphoproliferative lesions of the skin. *J Clin Pathol.* 2006;59(8):813-26.
7. Robson A. The pathology of cutaneous T-cell lymphoma. *Oncology (Williston Park).* 2007;21(2 Suppl 1):9-12.
8. Abbott RA, Sahni D, Robson A, Agar N, Whittaker S, Scarisbrick JJ. Poikilodermatous mycosis fungoides: a study of its clinicopathological, immunophenotypic, and prognostic features. *J Am Acad Dermatol.* 2011;65(2):313-9.
9. Dowling G, Freudenthal W. Dermatomyositis and poikiloderma atrophicans vascularis: a clinical and histological comparison. *Br J Dermatol.* 1938;50:519.
10. BLOOM D. Poikiloderma vasculare atrophicans with histologic features of mycosis fungoides. *Arch Derm Syphilol.* 1948;57(3 Pt. 2):589-91.
11. Lindae ML, Abel EA, Hoppe RT, Wood GS. Poikilodermatous mycosis fungoides and atrophic large-plaque parapsoriasis exhibit similar abnormalities of T-cell antigen expression. *Arch Dermatol.* 1988;124(3):366-72.
12. Farley-Loftus R, Mandal R, Latkowski JA. Poikilodermatous mycosis fungoides. *Dermatol Online J.* 2010;16(11):8.
13. Mataix J, Bañuls J, Lucas A, Belinchón I, Betlloch I. Poikilodermatous mycosis fungoides. *Int J Dermatol.* 2007;46(9):950-1.
14. Maskos K. Crystal structures of MMPs in complex with physiological and pharmacological inhibitors. *Biochimie.* 2005;87(3-4):249-63.

15. Lombard C, Saulnier J, Wallach J. Assays of matrix metalloproteinases (MMPs) activities: a review. *Biochimie*. 2005;87(3-4):265-72.
16. Kähäri VM, Saarialho-Kere U. Matrix metalloproteinases in skin. *Exp Dermatol*. 1997;6(5):199-213.
17. Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell*. 2010;141(1):52-67.
18. Lambert E, Dassé E, Haye B, Petitfrère E. TIMPs as multifacial proteins. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2004;49(3):187-98.
19. Inoue M, Kratz G, Haegerstrand A, Ståhle-Bäckdahl M. Collagenase expression is rapidly induced in wound-edge keratinocytes after acute injury in human skin, persists during healing, and stops at re-epithelialization. *J Invest Dermatol*. 1995;104(4):479-83.
20. Saarialho-Kere UK, Vaalamo M, Airola K, Niemi KM, Oikarinen AI, Parks WC. Interstitial collagenase is expressed by keratinocytes that are actively involved in reepithelialization in blistering skin disease. *J Invest Dermatol*. 1995;104(6):982-8.
21. Bou-Gharios G, Osman J, Black C, Olsen I. Excess matrix accumulation in scleroderma is caused partly by differential regulation of stromelysin and TIMP-1 synthesis. *Clin Chim Acta*. 1994;231(1):69-78.
22. Kerkelä E, Saarialho-Kere U. Matrix metalloproteinases in tumor progression: focus on basal and squamous cell skin cancer. *Exp Dermatol*. 2003;12(2):109-25.

23. Hofmann UB, Houben R, Bröcker EB, Becker JC. Role of matrix metalloproteinases in melanoma cell invasion. *Biochimie*. 2005;87(3-4):307-14.
24. Massagué J. TGFbeta in Cancer. *Cell*. 2008;134(2):215-30.
25. Mitsiades N, Yu WH, Poulaki V, Tsokos M, Stamenkovic I. Matrix metalloproteinase-7-mediated cleavage of Fas ligand protects tumor cells from chemotherapeutic drug cytotoxicity. *Cancer Res*. 2001;61(2):577-81.
26. Ardi VC, Kupriyanova TA, Deryugina EI, Quigley JP. Human neutrophils uniquely release TIMP-free MMP-9 to provide a potent catalytic stimulator of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(51):20262-7.
27. Friedl P, Wolf K. Tube travel: the role of proteases in individual and collective cancer cell invasion. *Cancer Res*. 2008;68(18):7247-9.
28. Agrawal S, Anderson P, Durbeej M, van Rooijen N, Ivars F, Opdenakker G, et al. Dystroglycan is selectively cleaved at the parenchymal basement membrane at sites of leukocyte extravasation in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med*. 2006;203(4):1007-19.
29. Keskinov AA, Shurin MR. Myeloid regulatory cells in tumor spreading and metastasis. *Immunobiology*. 2015;220(2):236-42.
30. Oikarinen A, Kylmäniemi M, Autio-Harmainen H, Autio P, Salo T. Demonstration of 72-kDa and 92-kDa forms of type IV collagenase in human skin: variable expression in various blistering diseases, induction during re-epithelialization, and decrease by topical glucocorticoids. *J Invest Dermatol*. 1993;101(2):205-10.

31. Sakata K, Satoh M, Someya M, Asanuma H, Nagakura H, Oouchi A, et al. Expression of matrix metalloproteinase 9 is a prognostic factor in patients with non-Hodgkin lymphoma. *Cancer*. 2004;100(2):356-65.
32. Kuittinen O, Apaja-Sarkkinen M, Turpeenniemi-Hujanen T. Gelatinases (MMP-2 and MMP-9), TIMP-1 expression and the extent of neovascularization in aggressive non-Hodgkin's lymphomas. *Eur J Haematol*. 2003;71(2):91-9.
33. Kossakowska AE, Hinek A, Edwards DR, Lim MS, Zhang CL, Breitman DR, et al. Proteolytic activity of human non-Hodgkin's lymphomas. *Am J Pathol*. 1998;152(2):565-76.
34. Diao LP, Ma H, Wei GC, Li T, Liu HS, Liu LH, et al. Matrix metalloproteinase-2 promoter and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 gene polymorphisms in non-Hodgkin's lymphoma. *Int J Cancer*. 2012;131(5):1095-103.
35. Vasku A, Vasku JB, Necas M, Vasku V. Matrix metalloproteinase-2 promoter genotype as a marker of cutaneous T-cell lymphoma early stage. *J Biomed Biotechnol*. 2010;2010:805907.
36. Vacca A, Moretti S, Ribatti D, Pellegrino A, Pimpinelli N, Bianchi B, et al. Progression of mycosis fungoides is associated with changes in angiogenesis and expression of the matrix metalloproteinases 2 and 9. *Eur J Cancer*. 1997;33(10):1685-92.
37. Saarialho-Kere UK, Chang ES, Welgus HG, Parks WC. Distinct localization of collagenase and tissue inhibitor of metalloproteinases

expression in wound healing associated with ulcerative pyogenic granuloma.

J Clin Invest. 1992;90(5):1952-7.

38. Stetler-Stevenson M, Mansoor A, Lim M, Fukushima P, Kehrl J, Marti G, et al. Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in reactive and neoplastic lymphoid cells. Blood. 1997;89(5):1708-15.

39. Aoudjit F, Masure S, Opdenakker G, Potworowski EF, St-Pierre Y. Gelatinase B (MMP-9), but not its inhibitor (TIMP-1), dictates the growth rate of experimental thymic lymphoma. Int J Cancer. 1999;82(5):743-7.

40. Vacca A, Ribatti D, Ria R, Pellegrino A, Bruno M, Merchionne F, et al. Proteolytic activity of human lymphoid tumor cells. Correlation with tumor progression. Dev Immunol. 2000;7(2-4):77-88.

41. Rasheed H, Tolba Fawzi MM, Abdel-Halim MR, Eissa AM, Mohammed Salem N, Mahfouz S. Immunohistochemical study of the expression of matrix metalloproteinase-9 in skin lesions of mycosis fungoides. Am J Dermatopathol. 2010;32(2):162-9.

42. Hembry RM, Ehrlich HP. Immunolocalization of collagenase and tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) in hypertrophic scar tissue. Br J Dermatol. 1986;115(4):409-20.

43. Kossakowska AE, Urbanski SJ, Edwards DR. Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) RNA is expressed at elevated levels in malignant non-Hodgkin's lymphomas. Blood. 1991;77(11):2475-81.

44. Wang C, Cai X, Chen B, He Z, Chen Z, Cen J, et al. Up-regulation of tissue inhibitor of metalloproteinase-2 promotes SHI-1 cell invasion in nude mice. *Leuk Lymphoma*. 2013;54(12):2707-11.
45. Guitart J, Kennedy J, Ronan S, Chmiel JS, Hsiegh YC, Variakojis D. Histologic criteria for the diagnosis of mycosis fungoides: proposal for a grading system to standardize pathology reporting. *J Cutan Pathol*. 2001;28(4):174-83.
46. Mahajan VK, Chauhan PS, Mehta KS, Sharma AL. Poikiloderma vasculare atrophicans: a distinct clinical entity? *Indian J Dermatol*. 2015;60(2):216.
47. Bloom B, Marchbein S, Fischer M, Kamino H, Patel R, Latkowski JA. Poikilodermatous mycosis fungoides. *Dermatol Online J*. 2012;18(12):4.