

DANIEL EUGENIO MONTEZZO

Macrófagos M2 no microambiente cutâneo da micose fungoide e da síndrome de Sézary e seu impacto no comprometimento linfonodal

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

Programa: Patologia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Mirian Nacagami Sotto

São Paulo

2023

DANIEL EUGENIO MONTEZZO

Macrófagos M2 no microambiente cutâneo da micose fungoide e da síndrome de Sézary e seu impacto no comprometimento linfonodal

Versão Original

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

Programa: Patologia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Mirian Nacagami Sotto

São Paulo

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Montezzo, Daniel Eugenio
Macrófagos M2 no microambiente cutâneo da micose
fungóide e da síndrome de Sézary e seu impacto no
comprometimento linfonodal / Daniel Eugenio
Montezzo. -- São Paulo, 2023.
Tese (doutorado) -- Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Patologia.
Orientadora: Mirian Nacagami Sotto.

Descritores: 1.Linfoma cutâneo de células T
2.Micose fungoide 3.Síndrome de Sézary
4.Microambiente tumoral 5.Macrófagos 6.Macrófagos
associados a tumor

USP/FM/DBD-190/23

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

DEDICATÓRIA

Aos meus estimados pais, irmão e à minha amada esposa, os alicerces inabaláveis que me proporcionaram a possibilidade de conquistar sonhos e efetivar grandiosas realizações. A todos aqueles que, com sua generosidade e intervenção, salvaguardaram minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Dra. Mirian Nacagami Sotto pelo imenso privilégio de tê-la como minha orientadora. Sua confiança em mim nos momentos mais desafiadores foi fundamental para o meu crescimento acadêmico e pessoal. Além disso, sou grato por ter tido a oportunidade de aprender e trocar experiências com uma das maiores autoridades do assunto. Seu conhecimento, dedicação e apoio foram verdadeiramente inspiradores. Obrigado por todo o seu suporte e por contribuir de maneira significativa para a minha jornada.

Ao Grupo de Linfomas Cutâneos do Departamento e Divisão de Clínica Dermatológica da FMUSP/HCFMUSP, representado pelo professor José Antônio Sanches, pela abertura, conhecimento e colaboração ao longo deste projeto. Ao Dr. Bruno de Castro e Souza, pelas suas ideias brilhantes e pela árdua missão de levantar e analisar os prontuários. Seu comprometimento e dedicação foram imprescindíveis para o sucesso desta pesquisa. Ao Dr. Denis Ricardo Miyashiro e à Dra. Jade Cury Martins, pelo seu valioso suporte científico ao longo do projeto.

À Dra. Naiura Vieira Pereira, pela destreza na realização e padronização das reações imunohistoquímicas de dupla marcação, e a todos os colaboradores do Laboratório de Dermatologia Tropical do Departamento de Dermatologia FMUSP, que foram essenciais no desenvolvimento do projeto.

Às técnicas do Laboratório de Dermatopatologia da Divisão de Clínica Dermatológica do HC-FMUSP: Maria Cristina Galhardo, Jacqueline Meneghin, Flavia Cristaldi, Luciana Cassemiro e Antônio Marques Santos Filho, pela dedicação e excelência demonstradas na realização dos cortes, no levantamento e na organização dos casos, que foram fundamentais para a qualidade e precisão dos resultados obtidos.

À Divisão de Anatomia Patológica do HC-FMUSP, minha casa de formação, e a todos os seus colaboradores. Em especial para Dra. Sheila Aparecida Coelho Siqueira. Sinto-me verdadeiramente privilegiado pela sua amizade e pelos valiosos ensinamentos que recebi ao longo de minha formação.

Ao Instituto de Patologia Andradina, minha casa atual, e seus colaboradores pelo apoio na realização dos cortes e colorações.

Ao Sr. Thiago Rezende, secretário do Programa de Patologia do Curso de Pós-Graduação da FMUSP, pela presteza em sempre ajudar e orientar os pós-graduandos.

ΕΠÍΓΡΑΦΕ

"O pessimista vê a dificuldade em cada oportunidade; o
otimista vê a oportunidade em cada dificuldade."

Bertram Carr

NORMATIZAÇÃO ADOTADA

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta 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 Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com List of Journals Indexed in Index Medicus.

SUMÁRIO

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LISTA DE SÍMBOLOS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE QUADROS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE GRÁFICOS

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO -----	1
2. REVISÃO DA LITERATURA -----	4
2.1. Características e conceitos nos linfomas cutâneos -----	5
2.2. Epidemiologia -----	7
2.3. Etiologia e fisiopatologia-----	8
2.4. Características clínicas -----	9
2.5. Características histopatológicas e moleculares -----	11
2.6. Estadiamento, prognóstico e tratamento -----	13
2.7. Subpopulações de macrófagos e comportamento biológico de neoplasias -----	16
2.8. Macrófagos M2 do ambiente tumoral nas neoplasias linfoides-----	19
2.9. Macrófagos M2 e terapêutica alvo nos processos linfoproliferativos -----	20
2.10. Identificação de macrófagos M2 nos tecidos -----	21
3. OBJETIVOS -----	23

3.1. Objetivo primário (objetivo geral)-----	24
3.2. Objetivos secundários (objetivos específicos) -----	24
4. CASUÍSTICA E MÉTODOS -----	25
4.1. Casuística-----	26
4.2. Análise histopatológica -----	27
4.3. Técnicas imunohistoquímicas para avaliação imunofenotípica do processo linfomatoso -----	29
4.4. Técnica imunohistoquímica de dupla marcação para marcação de macrófagos de fenótipo M2-----	30
4.5. Análise de risco e medidas de proteção-----	33
4.6. Quantificação das células imunomarcadas-----	33
4.7. Critérios de não inclusão de pacientes e amostras no estudo -----	36
4.8. Grupos de análise -----	36
4.9. Análise estatística -----	37
5. RESULTADOS-----	39
5.1. Caracterização da casuística, estadiamento ao longo do acompanhamento e sobrevida -----	40
5.2. Análise histopatológica e imunohistoquímica -----	46
5.3. Análise histopatológica e dos perfis imuofenotípicos -----	47
5.4. Análise dos macrófagos M2-----	53
6. DISCUSSÃO-----	64
7. CONCLUSÕES -----	71
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	74
9. ANEXOS -----	84

Anexo 1 - Relatório de aprovação da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAPPesq-HCFMUSP) 85

Anexo 2 - Tabelas -----88

Tabela 1 - Diagnósticos dos pacientes ao longo do acompanhamento -----88

Tabela 2 - Estadio ISCL/EORTC (TNMB)^{20,60} dos pacientes ao longo do acompanhamento-----91

Tabela 3 - Escore de Guitart et al.¹² dos pacientes ao longo dos tempos de acompanhamento -----93

Tabela 4 - Escore de positividade imunohistoquímica expresso em cruzes (1+ a 5+)-----95

Tabela 5 - Número de macrófagos M2/mm² nos três tempos de acompanhamento dos pacientes ---98

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> (soroalbumina bovina)
CCR	Receptor de quimiocina C-C
CCL	<i>Chemokine (C-C motif) ligand</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
c-MAF	<i>Musculoaponeurotic fibrosarcoma proto oncogene c</i>
CMV	Citomegalovírus
CLA	<i>Cutaneous lymphocyte-associated antigen</i>
CLG	Cutis laxa granulomatosa
Cód.	Código
CSF-1R	<i>Colony stimulating factor 1 receptor</i>
CXCL	<i>Chemokine C-X-C motif ligand</i>
CXCR	<i>Chemokine C-X-C motif receptor</i>
DAB	Diaminobenzidina
DAP	Divisão de anatomia patológica
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNM3	Dynamín-3
EBV	Vírus de Epstein-Barr

EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
EORTC	<i>International Society of Cutaneous Lymphoma</i>
EPH4	Linhagem celular epitelial H4
et al.	e outros
F	Feminino
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HHV	Herpes vírus humano
HLA	<i>Human Leucocyte Antigen</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
HTLV	Vírus T Linfotrópico Humano
IC	Intervalo de confiança
IFN-γ	Interferon-gama
IL	Interleucina
INCA	Instituto Nacional do Câncer
ISCL	<i>International Society of Cutaneous Lymphoma</i>
J	Índice de Youden
JAK	Janus kinase
LH	Linfoma de Hodgkin
LNH	Linfoma não Hodgkin
LPS	Lipopolissacaridase

KIRDL2	<i>Killer cell immunoglobulin like receptor 2</i>
M	Masculino
MCED	Morto com evidência de doença
MCP	<i>Monocyte chemoattractant protein</i>
MF	Micose fungoide
MFE	Micose fungoide eritrodérmica
MFF	Micose fungoide foliculotrópica
MFT	Micose fungoide transformada
MMP	Metaloproteinases de matriz
n	Número absoluto
NA	Não se aplica
NF-κB	Fator de transcrição nuclear kappa B
NGS	<i>Next generation sequencing</i>
NK	<i>Célula natural killer</i>
NKp46	<i>NK activating receptor</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
p	Nível de significância estatística
PBS	Phosphate-buffered saline buffer (solução salina tamponada com fosfatos)
PCR	Reação em cadeia de polimerase
PD1	Proteína de morte celular programada 1

PDL1	Ligante da proteína de morte celular programada 1
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
PLS3	Plastin-3
p-STAT	<i>Phosphorylated signal transducers and activator of transcription</i>
ROC	<i>Receiver Operator Characteristic</i>
SOE	Sem outras especificações
SS	Síndrome de Sézary
STAT	<i>Signal transducers and activator of transcription</i>
TAMs	<i>Tumor associated macrophages</i>
T CD4	Linfócito T CD4; linfócito T auxiliar
T CD8	Linfócito T CD8; linfócito T citotóxico
TCR	<i>T cell receptor</i> (receptor de células T)
TGF-β	Fator de transformação do crescimento – beta
Th	Linfócitos T auxiliares
TLR	Receptor <i>Toll-like</i>
TNMB	Tumor; linfonodos; metástase; sangue
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
Treg	Células T-reguladoras
TWIST1	<i>Twist-related protein 1</i>

VCED	Vivo com evidência de doença
VEGF	<i>Vascular endothelial growth fator</i> (fator de crescimento endotelial e vascular)
WHO	<i>World Health Organization</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
μm	Micrômetro
°C	Grau Celsius
máx	Máximo
mg/dl	Miligramma por decilitro
min	Minuto
mín	Mínimo
ml	Mililitro
mm	Milímetro
mm²	Milímetro quadrado
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
δ	Delta
®	Marca registrada
>	Maior que
≥	Maior ou igual a
<	Menor que

\leq	Menor ou igual a
$=$	Igualdade (igual a)
$-$	Subtração, menos ou negativo
$+$	Mais ou positivo
\pm	Mais ou menos

LISTA DE TABELAS

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Anticorpos do painel imunofenotípico utilizado no estudo de linfomas (pele e linfonodo), código/clones, procedência e diluição	29
Tabela 2 - Painel de anticorpos proposto para identificação de macrófagos M2.....	31
Tabela 3 - Frequência de sexo distribuída nos grupos de análise.....	40
Tabela 4 - Frequência de diagnósticos ao desfecho por sexo.....	42
Tabela 5 - Análise comparativa da mediana de estadiamento ISCL-EORTC ⁶⁰ ao longo do acompanhamento dos pacientes	43
Tabela 6 - Análise da sobrevida dos grupos de pacientes em cinco anos.....	45
Tabela 7 - Análise comparativa entre os diagnósticos na admissão e o diagnóstico final de pacientes com micose fungoide e síndrome de Sézary	46
Tabela 8 - Tabela comparativa das médias de macrófagos M2 por grupos.....	59
Tabela 9 - Comparação das médias do número de macrófagos M2/mm ² , à admissão, nas amostras de pele das lesões dos pacientes dos grupos de estudo que evoluíram com e sem envolvimento linfonodal	60
Tabela 10 - Dados da curva de características operacionais (ROC) de macrófagos M2/mm ² em amostras de biópsias à admissão de pacientes com linfoma que evoluíram com e sem envolvimento linfonodal	61
Tabela 11 - Comparação do número de macrófagos M2/mm ² nas amostras de pele de biópsias à admissão com o envolvimento linfonodal ao desfecho	62

LISTA DE QUADROS

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Classificação revisada WHO-EORTIC 2018 ²⁰ dos linfomas cutâneos primários	6
Quadro 2 - Classificação revisada da ISCL/EORTC (TNMB) ^{20,60} para micose fungoide e síndrome de Sézary.....	14
Quadro 3 - Sistema de estadiamento clínico para micose fungoide e síndrome de Sézary.....	15
Quadro 4 - Informações coletadas para análise	27
Quadro 5 - Critérios histológicos para a diagnose da micose fungoide	28
Quadro 6 - Escore para avaliação imunohistoquímica de marcadores linfomatosos.....	33

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estímulos polarizadores, expressões de moléculas de membrana e citocinas produzidas pelos macrófagos M1 e M2	18
Figura 2 - Ilustração da disposição dos cortes histológicos de amostras de pele de diferentes pacientes a serem submetidas às técnicas de imunohistoquímica	30
Figura 3 - Seleção de campos microscópicos para análise	34
Figura 4 - Marcação e contagem das células com dupla imunomarcação	35
Figura 5 - Exemplificação de caso específico	36
Figura 6 - Casuística.....	41
Figura 7 - Comparação das medianas do escore de Guitart et al. ¹² entre os grupos de pacientes com MF, SS e dermatoses inflamatórias ou idiopáticas	48
Figura 8 - Comparação das medianas do escore total de Guitart et al. ¹² entre os grupos de pacientes com e sem linfoma cutâneo nos três tempos de observação clínico-patológica	49
Figura 9 - Comparação das medianas do escore de Guitart et al. ¹² entre os grupos com linfomas cutâneos com e sem comprometimento linfonodal, nos três tempos de observação clínico-patológica	49
Figura 10 - Perfil imunofenotípico das amostras de pele de pacientes com micose fungoide (MF) ao longo do acompanhamento	50
Figura 11 - Perfil imunofenotípico das amostras de pele de pacientes com SS à admissão e no tempo intermediário	51
Figura 12 - Perfil imunofenotípico das amostras de pele de pacientes com dermatoses inflamatórias ou idiopáticas à admissão e no tempo intermediário	51
Figura 13 - Estudo microscópico dos macrófagos M2 nos casos 4, 5 e 6	54

Figura 14 - Estudo microscópico dos macrófagos M2 nos casos 16 e 17	55
Figura 15 - Estudo microscópico dos macrófagos M2 nos casos 10 e 12	56
Figura 16 - Estudo microscópico dos macrófagos M2 no caso 48	57
Figura 17 - Estudo microscópico dos macrófagos M2 nos casos 48 e 32	58
Figura 18 - Média do número de macrófagos M2 nas amostras de pele dos grupos de estudo ao longo do período de análise.....	59
Figura 19 - Curva de características operacionais (ROC) do número de macrófagos M2 na admissão e comprometimento linfonodal.....	61
Figura 20 - Comparação da densidade de macrófagos M2 (células/mm ²) nas amostras de biópsias do grupo de linfoma desde a sua admissão até o desfecho se vivo com doença ou morto pela doença..	63

LISTA DE GRÁFICOS

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Comparação da mediana de idade dos pacientes nos três tempos de análise e os respectivos quartis	42
Gráfico 2 - Análise comparativa da mediana do estadiamento ISCL-EORTC ⁶⁰ ao longo do acompanhamento dos pacientes e os respectivos quartis.....	44
Gráfico 3 - Curvas de sobrevida de acordo com os grupos de análise.....	45
Gráfico 4 - Evolução da perda de CD7 em relação ao CD3 dos grupos de linfoma com e sem acometimento nodal.....	52
Gráfico 5 - Evolução da relação CD4/CD8 entre os grupos de estudo (sem linfoma e com linfoma) à admissão e ao desfecho	53
Gráfico 6 - Diferença entre as médias de macrófagos M2/mm ² nas lesões cutâneas iniciais de cada grupo de estudo, de acordo com o comprometimento linfonodal	60
Gráfico 7 - Comparação do número de pacientes do grupo de linfoma com ou sem acometimento linfonodal ao desfecho em relação ao ponto de corte de ≥ 333 macrófagos M2/mm ² nas amostras de biópsia à admissão	62
Gráfico 8 - Comparação da média de macrófagos M2 (células/mm ²) nas amostras de biópsias à admissão do grupo de linfoma até o desfecho se vivo com doença ou morto pela doença	63

RESUMO

Montezzo DE. Macrófagos M2 no microambiente cutâneo da micose fungoide e da síndrome de Sézary e seu impacto no comprometimento linfonodal [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2023.

INTRODUÇÃO: A micose fungoide (MF) e a Síndrome de Sézary (SS) são os principais linfomas T cutâneos. Sua etiologia, ainda incerta, parece ser multifatorial, envolvendo fatores familiares, genéticos e ambientais. O microambiente tumoral contém linfócitos T neoplásicos e diversos componentes inflamatórios, como linfócitos T e B, citocinas, fatores de crescimento e macrófagos. Este estudo busca analisar a relação entre a quantidade de macrófagos M2 no microambiente tumoral de amostras de pele de pacientes com MF e SS e a progressão para envolvimento linfonodal em três etapas de acompanhamento, e de pacientes eritrodérmicos com causas não neoplásicas como controle. **MÉTODOS:** Este estudo retrospectivo de coorte avaliou prontuários, amostras de pele e linfonodos de 58 pacientes atendidos no Grupo de Linfomas Cutâneos da Divisão de Clínica Dermatológica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo entre 1988 e 2022. Foram selecionadas 134 amostras de pele de 55 pacientes, sendo classificadas conforme o escore histopatológico de Guitart et al. (2001) e imunofenotipadas. Paralelamente, 53 amostras de linfonodos desses pacientes selecionados foram estudadas para confirmação histológica do envolvimento nodal. As amostras de pele foram submetidas à dupla marcação imunohistoquímica com anticorpos “musculoaponeurótico fibrossarcoma c” (c-MAF) e o citoplasmático “cluster” de diferenciação 163 (CD163) para identificar macrófagos M2. Por fim, comparou-se o número de macrófagos M2/mm² entre pacientes com e sem comprometimento linfonodal. **RESULTADOS:** A prevalência dos linfomas foi maior em homens (1,1H:1M), com mediana de idade de início de 54 anos (53 na MF e 54 na SS). A taxa de sobrevivência em cinco anos foi de 88,8% sem envolvimento linfonodal e 70,1% com envolvimento linfonodal. A mediana do estadiamento inicial foi T2b N1 M0 B0a (estádio IIA) e final T3 N1b M0 B0b (estádio IIB). Os casos de SS foram inicialmente diagnosticados como condições inflamatórias e os de MF tiveram maior acurácia, sendo a variante foliculotrópica a que teve maior concordância com o desfecho. O escore histopatológico de Guitart et al. (2001) nos grupos MF e SS aumentou durante o acompanhamento, com diferença significativa (p=0,012 e p=0,029), porém não teve relação com o envolvimento linfonodal. O perfil imunofenotípico apresentou perda precoce de CD7 em pacientes com comprometimento linfonodal (p<0,001). A média de macrófagos M2/mm² na admissão foi maior nos pacientes com envolvimento linfonodal (p=0,024). Um ponto de corte de ≥ 333 macrófagos/mm² mostrou associação positiva com envolvimento linfonodal (p=0,026; Odds ratio: 10,8; 95% IC [1,58 a 65,9]). **CONCLUSÕES:** A análise dos macrófagos M2 por meio da técnica de dupla imunomarcagem revelou associação positiva com envolvimento linfonodal, com ponto de corte em ≥ 333 macrófagos/mm². A otimização dessa técnica imunohistoquímica mostrou-se viável e reprodutível para identificar macrófagos em material embebido em parafina, podendo ser usada como possível preditor de envolvimento linfonodal na primeira avaliação diagnóstica de pacientes com MF e SS.

Palavras-chave: Linfoma cutâneo de células T. Micose fungoide. Síndrome de Sézary. Microambiente tumoral. Macrófagos. Macrófagos associados a tumor.

ABSTRACT

Montezzo DE. M2 macrophages in the cutaneous microenvironment of mycosis fungoides and Sézary syndrome and their impact on lymph node involvement [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2023.

INTRODUCTION: Mycosis fungoides (MF) and Sézary syndrome (SS) are the primary cutaneous T-cell lymphomas. Their etiology remains uncertain, appearing to be multifactorial, involving familial, genetic, and environmental factors. The tumor microenvironment contains neoplastic T cells and various inflammatory components, such as T and B cells, cytokines, growth factors, and macrophages. This study aims to analyze the relationship between the quantity of M2 macrophages in the tumor microenvironment of skin samples from patients with MF and SS and the progression to lymph node involvement in three stages of follow-up, as well as erythrodermic patients with non-neoplastic causes as a control group. **METHODS:** This retrospective cohort study examined medical records, skin and lymph node samples from 58 patients who were followed up at the Cutaneous Lymphoma Group of the Dermatological Division at the Clinics Hospital, Faculty of Medicine, University of São Paulo between 1988 and 2022. A total of 134 skin samples from 55 patients were selected and classified according to the histopathological score of Guitart et al. (2001) and immunophenotyped. Concurrently, 53 lymph node samples from these selected patients were studied for histological confirmation of nodal involvement. Skin samples underwent dual immunohistochemical staining with c-musculoaponeurotic fibrosarcoma (c-MAF) and cytoplasmic cluster of differentiation 163 (CD163) antibodies to identify M2 macrophages. Finally, the number of M2 macrophages per mm² was compared between patients with and without lymph node involvement. **RESULTS:** The prevalence of lymphomas was higher in men (1.1M:1F), with a median age of onset of 54 years (53 in MF and 54 in SS). The five-year survival rate was 88.8% without lymph node involvement and 70.1% with lymph node involvement. The median initial staging was T2b N1 M0 B0a (stage IIA) and the final staging was T3 N1b M0 B0b (stage IIB). SS cases were initially diagnosed as inflammatory conditions, while MF cases had higher accuracy, with the folliculotropic variant showing the highest concordance with the outcome. The histopathological score by Guitart et al. (2001) in the MF and SS groups increased during follow-up, with a significant difference (p=0.012 and p=0.029), but it was not related to lymph node involvement. The immunophenotypic profile showed early loss of CD7 in patients with lymph node involvement (p<0.001). The average number of M2 macrophages per mm² at admission was higher in patients with lymph node involvement (p=0.024). A cut-off point of ≥ 333 macrophages/mm² demonstrated a positive association with lymph node involvement (p=0.026; Odds ratio: 10.8; 95% CI [1.58 to 65.9]). **CONCLUSIONS:** The analysis of M2 macrophages using the dual immunostaining technique revealed a positive association with lymph node involvement, with a cut-off point at ≥ 333 macrophages/mm². The optimization of this immunohistochemical technique proved to be feasible and reproducible for identifying macrophages in paraffin-embedded material, potentially serving as a predictor of lymph node involvement in the initial diagnostic evaluation of patients with MF and SS.

Keywords: Lymphoma, T-cell, cutaneous. Mycosis fungoides. Sezary syndrome. Tumor microenvironment. Macrophages. Tumor-associated macrophages.

1. INTRODUÇÃO

A micose fungoide (MF) e a Síndrome de Sézary (SS) são os tipos mais comuns de linfomas T da pele, compreendendo aproximadamente 53% dos casos de linfomas cutâneos. A SS geralmente tem um curso clínico agressivo, enquanto a MF, embora seja indolente na maioria dos casos, pode causar metástases linfonodais e até mesmo viscerais^{1,2}.

A etiologia desses dois linfomas ainda não é totalmente conhecida, presumindo-se ser multifatorial e envolver fatores familiares, genéticos e ambientais^{3,4,5,6,7,8}, possivelmente em um substrato de inflamação crônica como patogênese⁹.

O microambiente tumoral é um tema de grande interesse em várias neoplasias, incluindo as linfoides. Na MF e SS é composto por linfócitos T neoplásicos, além de uma grande quantidade de substrato inflamatório, como linfócitos T e B, citocinas, fatores de crescimento e macrófagos¹⁰.

As características clínicas, imunohistoquímicas e moleculares da MF e SS ainda não são bem definidas, o que torna difícil a padronização de critérios para o diagnóstico e classificação¹¹. Embora vários modelos tenham sido propostos, a reprodutibilidade e validação ainda não são consenso^{12,13,14}.

Os macrófagos são encontrados no microambiente de diversos tumores e seu processo de polarização está cada vez mais relacionado à progressão e comportamento das neoplasias¹⁵.¹⁶ Os macrófagos M1 e M2 desempenham papéis distintos em processos inflamatórios, sendo que o M1 tem uma função pró-inflamatória predominante e o M2, anti-inflamatória. O subtipo M2 tem sido encontrado com maior frequência no microambiente tumoral e está envolvido em processos de proliferação e disseminação de neoplasias, através de fatores de crescimento tumorais e angiogênicos¹⁷.

Considerando que existem evidências da participação dos macrófagos M2 na tumorigênese, invasão e metástase dos processos neoplásicos, há ainda poucos estudos sobre a relação dessas células com a progressão tumoral na MF e SS. Não foram encontrados dados, até o momento, sobre a relação entre TAMs (“tumor-associated macrophages”) e o comprometimento linfonodal nesses linfomas cutâneos, o que torna incerta a relevância da participação desta população celular no desenvolvimento e progressão da doença.

Este estudo visa investigar a relação entre a quantidade de macrófagos M2 presentes no microambiente tumoral de amostras de pele de pacientes com diagnóstico de MF e SS, e a progressão para o envolvimento nodal ao longo de três fases no acompanhamento e de pacientes eritrodérmicos de causas não neoplásicas como grupo controle.

Foi desenvolvido como estudo retrospectivo de coorte para avaliar amostras de pele de pacientes acompanhados no ambulatório do Grupo de Linfomas da Divisão de Clínica Dermatológica, arquivadas no Laboratório de Dermatopatologia da Divisão de Clínica Dermatológica. Avaliou-se, em conjunto, espécimes de linfonodo dos arquivos da Divisão de Anatomia Patológica (DAP), do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, no período de 1988 a 2022.

As amostras de pele classificadas segundo o escore histopatológico de Guitart et al.¹² e imunofenotipadas foram submetidas a dupla marcação imunohistoquímica, utilizando-se o anticorpo com marcação nuclear fator de transcrição “musculoaponeurótico fibrossarcoma c” (c-MAF) e o citoplasmático “cluster” de diferenciação 163 (CD163), para detecção dos macrófagos M2. Por fim, o número de macrófagos M2/mm² foi comparado entre pacientes com e sem comprometimento linfonodal.

A avaliação da participação dos macrófagos M2 no microambiente cutâneo da MF e SS poderá contribuir para um melhor entendimento da patogênese e seu impacto na previsão de evolução e agressividade dessas neoplasias. Esse conhecimento poderá contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias de avaliação prognóstica e terapêuticas, visando à modulação do microambiente tumoral com a consequente supressão do crescimento neoplásico e prevenção do desenvolvimento de metástases.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Características e conceitos nos linfomas cutâneos

Linfoma é um termo genérico utilizado para descrever um grupo heterogêneo de neoplasias que se desenvolvem a partir do sistema linforreticular. Possuem diversas etiologias, tratamentos e desfechos, sendo divididos basicamente em dois grandes grupos: linfoma de Hodgkin (LH) e linfoma não Hodgkin (LNH)¹.

O LH corresponde a cerca de 15% de todos os linfomas e tem como característica clínica o envolvimento nodal, principalmente da região mediastinal, cervical, supraclavicular e axilar. Já os LNH correspondem a 85% de todos os linfomas e podem cursar com acometimento extranodal, sendo a pele o segundo órgão mais envolvido¹⁸.

Os linfomas cutâneos primários representam subtipos clínico-patológicos distintos de linfomas extranodais. São definidos como neoplasias do sistema imune, caracterizadas por proliferação de células T, “Natural Killers” (NK) ou linfócitos B, que possuem um peculiar tropismo pela pele. Por definição, não apresentam acometimento extracutâneo no momento do diagnóstico e devem ser separados de manifestações cutâneas secundárias de outros linfomas e leucemias. Com isso, torna-se necessária a avaliação multidisciplinar e investigação completa desses pacientes para conclusão diagnóstica, já que os prognósticos e tratamentos são completamente diferentes¹¹.

Por se tratar de um grupo heterogêneo de doenças, foram propostas inúmeras classificações ao longo das décadas. Em 1997, a “International Society of Cutaneous Lymphoma” (EORTC) publicou a primeira classificação de linfomas cutâneos. Ela foi posteriormente revisada em conjunto com a “World Health Organization” (WHO) em 2005¹⁹ e 2018²⁰, visando a uniformização dessas entidades e facilitando, assim, a comparação e padronização de dados entre diversos centros de pesquisa, conforme Quadro 1.

Quadro 1- Classificação revisada WHO-EORTIC 2018²⁰ dos linfomas cutâneos primários

Linfomas cutâneos de células T e células NK
<p>Micose fungoide;</p> <p>Micose fungoide – variantes:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Micose fungoide foliculotrópica; • Reticulose pagetóide; • Cútis laxa granulomatosa. <p>Síndrome de Sézary;</p> <p>Leucemia/linfoma de células T do adulto;</p> <p>Desordens linfoproliferativas de células T CD30-positivas cutâneas primárias:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Papulose linfomatóide; • Linfoma de grandes células anaplásicas cutâneo primário. <p>Linfoma subcutâneo de células T, paniculite-símile;</p> <p>Linfoma extranodal de células T/NK, tipo nasal;</p> <p>Infecção ativa crônica pelo vírus EBV.</p>
<p>Linfoma cutâneo primário de células T periféricas, subtipos raros:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Linfoma cutâneo primário de células T γ/δ; • Linfoma cutâneo primário agressivo de células T CD8 positivas epidermotrópicas; • Doença linfoproliferativa cutânea primária de pequenas e médias células T CD4 positivas; • Linfoma cutâneo primário de células T CD8 positivas acral. <p>Linfoma cutâneo primário de células T periféricas, SOE.</p>
Linfomas cutâneos de células B
<p>Linfoma cutâneo primário de células B da zona marginal;</p> <p>Linfoma cutâneo primário de células B centro folicular;</p> <p>Linfoma cutâneo primário difuso de células B, tipo perna;</p> <p>Úlcera muco cutânea EBV positiva;</p> <p>Linfoma cutâneo primário intravascular de grandes células B.</p>

FONTE: Willemze, et al.²⁰

NK: Natural Killers; CD: Cluster de diferenciação; EBV: Epstein-Barr vírus; SOE: sem outras especificações

Apesar da classificação da WHO-EORTC²⁰, descrita no Quadro 1, reconhecer apenas a MF clássica e três variantes, há uma série de variações clínico patológicas que são incluídas na

forma clássica. Cada uma dessas variações apresentam características clínicas e patológicas peculiares, sendo elas: hipopigmentada, poiquilodérmica, eritrodérmica, granulomatosa, hiperpigmentada, ictiosiforme, siringotrópica, papular, purpúrica, intersticial, pustular, bolhosa, verrucosa e psoriasiforme²¹.

2.2. Epidemiologia

A MF e a SS são os tipos mais comuns de linfoma cutâneo de células T, compreendendo aproximadamente 3,9% dos LNH, 53% dos linfomas cutâneos e 60% dos linfomas cutâneos de células T^{1,20}.

Descrita em 1806 pelo dermatologista francês Jean-Louis-Marc Alibert, a MF é um linfoma T cutâneo primário epidermotrópico. A incidência anual é de aproximadamente 2 a 4 casos por 1.000.000 de pessoas. Já na SS ela é de 0,1 a 0,3 casos por 1.000.000 de pessoas^{22,23}.

A variação de fatores geográficos e populacionais dificultam análises mais abrangentes. Segundo Korgavkar et al.²⁴, a incidência diminuiu nos Estados Unidos entre os anos de 1998 e 2009. No entanto, outros estudos mostram um aumento expressivo da incidência desde o início dos anos 1980²³.

No Brasil, as estatísticas são limitadas, mas dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA) estimam que, a cada ano do triênio 2020/2022, sejam diagnosticados 12.030 novos casos de linfoma não Hodgkin, sendo 6.580 em homens e 5.450 em mulheres. Esses valores correspondem a um risco estimado de 6,31 casos novos para cada 100 mil homens e 5,07 para cada 100 mil mulheres²⁵. Levando-se em consideração que os linfomas cutâneos correspondem a 3,9% de todos os LNH, e que a MF compreende 53% desses casos, pode-se estimar cerca de 248 novos casos de MF por ano.

Estudo recente realizado no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP) com uma casuística de 1334 pacientes em um período de 19 anos mostrou que 94,1% dos linfomas cutâneos eram linfomas T, e desses, 84,9% eram MF/SS. A forma clássica da MF correspondia a 41,8% dos casos, seguida pela variante foliculotrópica, que compreendia 4,9% dos casos. Os homens foram mais acometidos, correspondendo a 50,4% dos casos, com idade média de 55 anos²⁶.

É doença mais comum em homens, com proporção variando entre 1,5 e 1,7 homens para cada mulher^{1,22,27}. Estudo de Criscione e Weinstock²³ demonstra números superiores com a prevalência variando entre 1,6 e 2,1 homens para cada mulher.

Os dados a respeito do impacto da etnia nessas doenças são conflitantes devido à alta variabilidade de fatores populacionais e geográficos. Há dados de que a doença é predominante em pessoas negras^{23,28,29}. No entanto, alguns estudos, inclusive multicêntricos, mostram predominância em brancos, principalmente em centros da América do Norte e Europa²⁸.

A mediana de idade de início varia entre 50 e 60 anos^{22,28} na MF. Já a SS se inicia em pacientes com idade mais avançada que varia entre 60 e 65 anos e tem comportamento mais agressivo³⁰. Apesar de ser pouco frequente, a MF é também o linfoma cutâneo mais comum em crianças e adolescentes³¹, sendo o subtipo hipopigmentado mais comum entre jovens, com mediana de idade de início de 32 anos³².

2.3. Etiologia e fisiopatologia

A etiologia da MF e SS permanece desconhecida, apesar de vários estudos realizados ao longo dos anos, com foco principalmente na predisposição genética, relação familiar e fatores ambientais. No entanto, os estudos geralmente se restringem a relatos de casos e pequenas séries de casos²¹.

Os estudos realizados em gêmeos idênticos são controversos. Alguns deles revelaram a ocorrência da doença em gêmeos idênticos^{4,5} enquanto outros não evidenciaram o desenvolvimento da doença em um dos gêmeos, mesmo após uma média de 20 anos de observação⁶.

Alterações genéticas foram detectadas em estádios mais avançados da doença e não parecem ter relação com seu desenvolvimento inicial. A ativação de genes relacionados às vias inflamatórias, imunológicas e regulatórias da apoptose foi identificada em estádios iniciais da doença; no entanto, eles também foram observados em condições inflamatórias, não sendo específicos da condição linfomatoso. Hodak e Friedman⁴ demonstram um aumento na frequência alélica do “human leucocyte antigen” (HLA) DQB*03 em pacientes de etnia judaica israelense com MF, podendo ser um indício da influência genética no desenvolvimento dessas doenças.

Segundo Schimidt et al.³³, condições ambientais podem estar relacionadas, já que indivíduos casados e sem relação familiar desenvolveram MF. Dentre tais condições, a exposição a agentes químicos, alérgenos e agentes infecciosos pode predispor ao seu desenvolvimento. Estudo de Emadi et al.³⁴ relaciona uma incidência maior da doença em pacientes expostos a gás mostarda, e outro mostra que agentes bacterianos estão envolvidos no seu desenvolvimento, com estímulo da ativação do "signal transducers and activator of transcription" (STAT) 3 e expressão da interleucina (IL) 17⁷. Há também aqueles que sugerem relação com infecções virais, como o Vírus T Linfotrópico Humano (HTLV), o Epstein-Barr vírus (EBV), o citomegalovírus (CMV) e o herpes vírus humano (HHV) 8 e 6⁸. Outros relacionam baixo índice de vitamina D³⁵, exposições ocupacionais³⁶ e exposição a raios ultravioletas³⁷ ao desenvolvimento do linfoma.

A patogênese desses linfomas cutâneos também não é totalmente conhecida, presumindo-se que a neoplasia surja em um substrato de inflamação crônica. Na MF, as células neoplásicas teriam origem em linfócitos T da pele, enquanto na SS em linfócitos T centrais de memória. Na MF, os linfócitos neoplásicos expressam o receptor de quimiocina C-C (CCR) tipo 4 e o "Cutaneous Lymphocyte-Associated Antigen" (CLA). Ambos são importantes no tropismo dessas células pela pele. Em contrapartida, na SS, as células neoplásicas expressam os marcadores da MF, além de L-selectina, CCR tipo 7 e CD27. Este último é um marcador característico de células T centrais de memória⁹. Dessa forma, nota-se a distinção imunofenotípica entre essas duas entidades.

No microambiente tumoral, um elevado número de células T CD8 citotóxicas reativas e células T reguladoras FOXP3+ têm sido encontradas nas lesões precoces de MF. À medida que a doença progride elas diminuem de número. Por isso, parecem estar relacionadas com resposta antitumoral. Além disso, postula-se que uma variedade de citocinas secretadas por macrófagos esteja envolvida na patogênese da doença¹⁰.

2.4. Características clínicas

O curso clínico da MF é indolente e pode se estender por anos ou décadas. Tradicionalmente, as lesões da MF são divididas em três fases clínicas: "patches", placas e tumor. Embora as placas sejam consideradas uma característica clínica da MF precoce, deve-se atentar para o fato de que pacientes com doença avançada, que estão em remissão completa,

podem recidivar a doença apresentando qualquer um dos tipos de lesões, sendo as placas mais frequentes^{1,11,12,20}.

As “patches” são caracterizadas por lesões grandes, eritematosas com descamação fina. Se desenvolve comumente em regiões não expostas ao sol, como tronco abaixo da cintura, flancos, seios, parte interna das coxas e dos braços e áreas periaxilares. Podem ser generalizadas ou localizadas. Quando localizadas, têm preferência por regiões foto protegidas e nádegas. Quando generalizadas, as lesões são maiores e a descamação é variável. Em alguns casos, há degeneração de fibras colágenas e elásticas, além de atrofia epidérmica, ocasionando um aspecto de pele mais enrugada, descrito por alguns como aspecto em “pergaminho” ou “papel de cigarro”. Por vezes podem ganhar aspecto mais amarelado, conferindo um aspecto xantomizado (também chamado de “xanthoerythroderma perstans”). Estas características estão associadas a lesões mais crônicas e ajudam a diferenciar a MF de condições inflamatórias, que carecem deste tipo de alteração¹¹.

As placas têm tamanho e formato variados, são infiltradas com descamação variável e coloração castanho-avermelhada. Geralmente, são observadas em conjunto com as “patches”. Ulceração não é comum, sendo, em alguns casos, observadas crostas, por vezes, impetiginizadas. Em peles mais escuras, as lesões tendem a ser menos pigmentadas e eritematosas, tendo um aspecto mais acinzentado. Em asiáticos, as lesões mais ativas costumam ser mais hiperpigmentadas^{11,38}.

Lesões tumorais costumam ser solitárias e localizadas e, em grande parte das vezes, associadas com “patches” e placas. Podem ser ulceradas e sangrantes, características essas quase ausentes nas outras duas apresentações. Também podem acometer mucosas, havendo a necessidade de cuidado na distinção para com outros linfomas¹¹. Nem todos os pacientes com MF progridem de “patches” a placas ou tumores, porém as “patches” estão sempre presentes. Nos casos em que há apenas lesões tumorais, sem “patches” também deve ser considerado o diagnóstico diferencial com outros linfomas cutâneos²¹.

O prurido é um sintoma comum em todos os estádios³⁹. Alterações do aparato ungueal, como onicodistrofia, espessamento, onicólise, hemorragias e outras alterações, podem estar presentes em estádios mais avançados⁴⁰. O acometimento de regiões acrais, como palmas e solas, é característica de variantes siringotrópicas. A eritrodermia (eritema difuso e descamação

da pele que comprometem 90% ou mais da área total da superfície corporal) são achados que dificultam o diagnóstico diferencial entre MF e SS^{11,13}.

2.5. Características histopatológicas e moleculares

Os diagnósticos histopatológico e imunohistoquímico dessas condições são complexos, sendo muito relevante a experiência do patologista para o direcionamento e a conclusão diagnóstica em conjunto com o clínico. As alterações histopatológicas da MF incluem epidermotropismo de linfócitos pequenos e médios atípicos, maiores do que os observados na derme, com núcleos aumentados de volume, por vezes de aspecto cerebriforme, que se dispõem alinhados por entre os queratinócitos. São envoltos por halo claro e formam, quando agrupados, os chamados microabscessos de “Pautrier” (coleção de quatro ou mais linfócitos atípicos intraepidérmicos)^{11,12,13,41}.

Transformação para grandes células (MF transformada) é um achado histopatológico caracterizado pela presença de células quatro vezes maior que um linfócito normal em 25% ou mais do infiltrado dérmico. Podem expressar ou não a molécula CD30, sendo necessária distinção com outros linfomas CD30 positivos⁴². Estudo de Raghavan et al.⁴³ demonstrou maior expressão do antígeno Ki-67 nas lesões precoces que progrediram para transformação em grandes células.

Com o advento de estudos moleculares de clonalidade, estima-se que as células T neoplásicas correspondem a cerca de 10% do infiltrado dérmico, implicando maior cuidado na avaliação histopatológica e molecular das lesões precoces⁴⁴.

Devido às dificuldades diagnósticas da MF em sua fase inicial, alguns autores propuseram algoritmos para o seu diagnóstico precoce. O algoritmo proposto por Guitart et al.¹², mais bem discutido na seção de casuística e método, propõe escores com base nos aspectos histopatológicos observados nas lesões. Outras propostas associam as características histopatológicas às clínicas^{13,14,45,46}, avaliação imunofenotípica por técnica de imunohistoquímica e inclusão de dados moleculares^{47,48,49}. Mais recentemente, autores testam a inteligência artificial e "deep learning" como nova ferramenta no diagnóstico da micose fungoide, utilizando micrografias e algoritmos para medição de parâmetros nucleares dos linfócitos⁵⁰.

A MF é caracterizada pelo fenótipo de células T "helper" (Th) $\alpha\beta$ de memória. Esses linfócitos usualmente expressam as moléculas CD2, CD3, β F1, CD4, CD5 e CD7. Na MF e SS, frequentemente ocorre perda da expressão do marcador CD7 já nas fases precoces da doença¹. Além disso, há aumento importante da relação CD4+/CD8+, com média de 3,5⁴⁹. No entanto, há relatos de caso na literatura de dupla positividade e negatividade para esses marcadores^{51,52}.

A SS é caracterizada por eritrodermia e envolvimento sanguíneo, geralmente apresentando curso clínico mais agressivo e com pior prognóstico. Alguns autores a consideram uma manifestação leucêmica da micose fungoide, porém segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), trata-se de uma entidade distinta. Os critérios para seu diagnóstico incluem a demonstração de população monoclonal de células T no sangue periférico por métodos genético-moleculares, aumento de CD4 com razão CD4+/CD8+ maior que 10 e anormalidades imunofenotípicas como ausência da expressão de antígenos de superfície (CD2, CD3, CD4 e/ou CD5)^{1,13,20,38}.

Na SS, geralmente observa-se proliferação psoriasiforme da epiderme com infiltrado linfocitário em faixa e epidermotropismo menos intenso quando comparado com o observado na MF. Contudo, as alterações histopatológicas cutâneas da MF e da SS podem ser indistinguíveis, sendo que alguns estudos relatam que mais de 50% das biópsias cutâneas de SS apresentam alterações inespecíficas e não conclusivas para linfoma^{1,2,13,20,53}. Por isso, a demonstração do envolvimento sanguíneo periférico é essencial para o diagnóstico de SS.

Os critérios para envolvimento sanguíneo incluem, além da demonstração de células T neoplásicas na pele e no sangue periférico, uma contagem absoluta de células de Sézary maior que 1.000/ μ L ou uma população de células T CD4+ aumentada, resultando em uma proporção de CD4+/CD8+ \geq 10, células CD4+/CD7- \geq 30% ou células CD4+/CD26- \geq 40%²⁰.

Exames de reação em cadeia de polimerase (PCR) e sequenciamento de próxima geração (NGS) permitem a pesquisa do rearranjo do receptor de células T (TCR) em amostras de pele, sangue e linfonodos, para confirmar a clonalidade da proliferação celular em linfomas cutâneos⁴⁴.

Estudos recentes descrevem novos biomarcadores, entre eles, a proteína de morte celular programada 1 (PD-1) e "killer cell immunoglobulin-like receptor" 2 (KIRDL2). Com isso,

espera-se facilitar a diferenciação entre SS e outras dermatites eritrodérmicas na pele e no sangue periférico^{54,55}.

As células de Sézary circulantes também mostram um padrão característico com superexpressão de “plastin” 3 (PLS3), “twist-related protein” 1 (TWIST1), “dynamin” 3 (DNM3), linhagem de células epiteliais EpH4, KIRDL2, "Natural Killer activating receptor" (NKp46) e expressão reduzida do "signal transducer and activator of transcription" 4 (STAT-4)^{56,57}. Lançar mão desses marcadores pode auxiliar consideravelmente o diagnóstico da doença, porém ainda não são utilizados rotineiramente na prática clínica.

Outros estudos também mostraram determinadas alterações em genes envolvidos na ativação das células T, regulação do ciclo celular, reparo de danos ao DNA, remodelamento da cromatina, ativação do fator de transcrição nuclear kappa B (NF-κB) e sinalização “Janus kinase” (JAK)-STAT^{58,59}. Com isso, espera-se que haja uma melhor compreensão dos processos envolvidos na patogênese da SS. Além disso, essas alterações genômicas podem servir de futuros alvos terapêuticos para novas drogas.

2.6. Estadiamento, prognóstico e tratamento

O sistema de estadiamento para MF e SS baseia-se nos critérios da “International Society of Cutaneous Lymphoma/European Organizations for Research and Treatment of Cancer” (ISCL/EORTC), que consideram o tipo e a extensão da lesão cutânea, envolvimento linfonodal e visceral^{20,60} (ver Quadros 2 e 3). Este sistema usado para a MF é o mesmo para a SS, sendo que nesta também deve haver eritrodermia, linfadenopatia generalizada, e células T clonais na pele, sangue periférico e linfonodo⁶¹. Por definição, a SS se enquadra no estágio III desde o seu início⁶².

Quadro 2 - Classificação revisada da ISCL/EORTC (TNMB)^{20,60} para micose fungoide e síndrome de Sézary

Pele (T)
<p>T1 - Manchas (patches)/placas limitadas (envolvendo <10% da superfície total da pele):</p> <ul style="list-style-type: none"> • T1a - Apenas patches; • T1b - Placas ± patches.
<p>T2 - Manchas (patches)/placas generalizadas (envolvendo ≥ 10% da superfície total da pele):</p> <ul style="list-style-type: none"> • T2a - Apenas patches; • T2b - Placas ± patches.
T3 - Tumor(es).
T4 – Eritrodermia.
Linfonodo (N)
N0 - Sem linfonodos periféricos anormais do ponto de vista clínico;
<p>N1 - Linfonodos periféricos clinicamente anormais; linfadenite dermatopática ou envolvimento histológico por linfócitos atípicos isolados sem alteração da arquitetura linfonodal:</p> <ul style="list-style-type: none"> • N1a - Clone negativo; • N1b - Clone positivo.
<p>N2 - Linfonodos periféricos clinicamente anormais; envolvimento histológico por agregados de linfócitos atípicos sem alteração da arquitetura linfonodal:</p> <ul style="list-style-type: none"> • N2a - Clone negativo; • N2b - Clone positivo.
N3 - Linfonodos periféricos clinicamente anormais; comprometimento histológico franco com alteração parcial ou total da arquitetura linfonodal
NX - Linfonodos periféricos clinicamente anormais; sem confirmação histológica
Vísceras (M)
M0 - Sem envolvimento visceral
M1 - Com envolvimento visceral

continua

Quadro 2 - Classificação revisada do TNMB para micose fungoide e síndrome de Sézary (conclusão)

Sangue (B)
<p>B0 - Não há células atípicas (Sézary) circulantes (ou <5% de linfócitos atípicos):</p> <ul style="list-style-type: none"> • B0a - Clone negativo; • B0b - Clone positivo.
<p>B1 - Baixa carga tumoral no sangue ($\geq 5\%$ dos linfócitos são células Sézary, mas não B2):</p> <ul style="list-style-type: none"> • B1a - Clone negativo • B1b - Clone positivo
<p>B2 - Elevada carga tumoral no sangue e rearranjo clonal do TCR (≥ 1.000 células de Sézary/microL. e/ou $CD4:CD8 \geq 10$, e/ou $CD4+CD7 - \geq 40\%$, e/ou $CD4+CD26 - \geq 30\%$).</p>

FONTE: Sanches et al.⁶³

T: pele; N: linfonodo; M: víscera; B: sangue periférico; ISCL/ EORTC: International Society of Cutaneous Lymphoma/European Organizations for Research and Treatment of Cancer”

Quadro 3 - Sistema de estadiamento clínico para micose fungoide e síndrome de Sézary

Estádio clínico	Classificação TNMB			
Ia	T1	N0	M0	B0 ou B1
Ib	T2	N0	M0	B0 ou B1
IIa	T1 ou T2	N1 ou N2	M0	B0 ou B1
IIb	T3	N0 a N2	M0	B0 ou B1
IIIa	T4	N0 a N2	M0	B0
IIIb	T4	N0 a N2	M0	B1
IVa1	T1 a T4	N0 a N2	M0	B2
IVa2	T1 a T4	N3	M0	B0 a B2
IVb	T1 a T4	N0 a N3	M1	B0 a B2

FONTE: Sanches et al.⁶³

T: pele; N: linfonodo; M: víscera; B: sangue periférico

O prognóstico dos pacientes correlaciona-se com o estágio clínico da doença. A maioria dos doentes com MF, ao diagnóstico, apresenta-se em estágio precoce, caracterizado por máculas e placas eritemato-descamativas, de longa duração, não progredindo para estágios mais avançados da doença. Pacientes com doença limitada à pele têm sobrevida semelhante à população normal, sendo a sobrevida em cinco anos de 91 a 97%. Outros podem evoluir lentamente, ao longo dos anos ou até décadas, com máculas e pápulas disseminadas, "patches"

e placas infiltradas, com sobrevida em cinco anos de cerca de 81 a 85%. Uma minoria dos doentes progride para estádios mais avançados, cursando com lesões tumorais ou eritrodérmicas com acometimento linfonodal e raramente visceral, com sobrevida média de aproximadamente 44% para tumores e 20 a 30% com acometimento linfonodal^{1,2,20,38,45,64}. A MF transformada tem prognóstico pior com sobrevida em cinco anos de 38,5%³⁸.

A SS é um linfoma agressivo com sobrevida em cinco anos de cerca de 40 a 50%^{20,21}.

Cerca de 80% dos pacientes não possuem suspeita de acometimento nodal à admissão, exceto pacientes eritrodérmicos, incluídos os com SS, que frequentemente apresentam aumento linfonodal difuso⁶⁵.

Trabalho multicêntrico internacional, com a participação do grupo de Linfomas Cutâneos do Departamento de Dermatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), demonstrou que as variáveis: idade dos pacientes maior que 60 anos, transformação para células grandes no exame anatomopatológico das lesões cutâneas e níveis aumentados de desidrogenase láctica são variáveis independentes para o mau prognóstico dos doentes com MF e SS³⁸.

As modalidades de tratamento podem ser divididas em dois grupos: terapias direcionadas à pele e terapias sistêmicas, podendo ser usadas em monoterapia ou de forma combinada. As terapias direcionadas à pele incluem agentes tópicos, fototerapia e radioterapia, sendo utilizadas em estádios iniciais (estádio IA-IIA) com o objetivo de controlar a doença, melhorar os sintomas e a qualidade de vida dos pacientes. Já as terapias sistêmicas abrangem modificadores da resposta biológica, imunoterapias e agentes quimioterápicos, sendo empregadas na MF em estágio inicial refratário, na MF em estágio tardio (estádio \geq IIB) e na SS, podendo ser combinadas ou não a uma terapia direcionada à pele⁶³.

2.7. Subpopulações de macrófagos e comportamento biológico de neoplasias

Estudos revelam um comportamento biológico mais agressivo de diversas neoplasias (como câncer de mama, próstata, ovário, colo uterino, melanoma cutâneo, carcinoma de boca, entre outros) relacionado à presença de subpopulações de macrófagos no microambiente tumoral^{15,66,67,68,69}.

O macrófago é uma célula derivada do monócito, componente da imunidade inata e originário da medula óssea. Os monócitos sanguíneos sofrem maturação e são ativados nos diversos tecidos. Os macrófagos do microambiente tumoral podem inibir ou promover o crescimento e a disseminação de neoplasias, dependendo de seu estado de ativação¹⁷.

Pesquisas demonstram diferentes comportamentos dos macrófagos a depender do tipo de citocina secretada no ambiente em que se encontram. Os macrófagos polarizados podem ser ativados pela via clássica (denominados macrófagos M1) e pela via alternativa (denominados macrófagos M2). Esses dois fenótipos podem se alterar ao longo do tempo devido à plasticidade deste tipo celular⁷⁰.

O tipo de resposta é definido pelo perfil Th que está sendo estimulado. O perfil Th1 ativa os macrófagos M1 com a secreção de interferon gama (IFN- γ), promovendo uma ação pró-inflamatória com efeito tumoricida. Este perfil está associado à produção de citocinas como IL-1 β , TNF- α , IL-6 e IL-23. Por outro lado, o perfil Th2 ativa os macrófagos M2 através de citocinas como IL-4, IL-10 e IL-13, que promovem ação de reparação tecidual, resolução da inflamação e está relacionado à cronicidade de doenças e progressão neoplásica¹⁷. As IL-4 e IL-13 induzem a produção da “Chemokine (C-C motif) ligand” (CCL) 18 pelos macrófagos M2, que se liga ao receptor CCR8 nas células Th2, T reguladoras (Treg) e eosinófilos. Estudos associam a maior concentração plasmática e em amostras de pele do CCL18 com pior prognóstico^{16,71}.

A maioria dos TAMs apresenta fenótipo M2 e representa a célula imune mais frequentemente encontrada no microambiente tumoral. Essa população celular favorece o crescimento tumoral por meio da liberação de substâncias pró-angiogênicas, como IL-10, prostaglandina, arginase e fatores de crescimento como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de transformação do crescimento beta (TGF- β) e metaloproteinases de matriz (MMP). Tais substâncias promovem fatores de crescimento tumoral, angiogênese, linfangiogênese e imunossupressão tumoral⁷⁰ (ver Figura 1).

Sabe-se ainda que há subdivisões dos macrófagos M2. A subpopulação M2a promove a expressão de CCL 17, CCL22 e CCL24, pela indução de IL-4 e IL-13, favorecendo a atração de eosinófilos, basófilos e células Th2. A subpopulação M2b secreta CCL1, uma citocina que, em conjunto com seu receptor CCR1, promove a infiltração de eosinófilos, células Th2 e células T reguladoras. Por fim, a subpopulação M2c expressa “chemokine C-X-C motif ligand”

(CXCL) 13, CCL16 e CCL18, pela ação da IL-10, que, em conjunto com os “chemokine C-X-C motif receptor” (CXCR) 5, CCR1 e CCR8, induzem o acúmulo de eosinófilos e células T inativas (T “naive”)^{16,70}.

Desse modo, os TAMs proporcionam condições locais e sistêmicas ideais para o crescimento, a sobrevivência e a motilidade das células tumorais^{72,73,74}. Além disso, há evidências de que os macrófagos tumorais interagem com células-tronco neoplásicas, atuando nos processos de tumorigênese, metástase e resistência a drogas¹⁶.

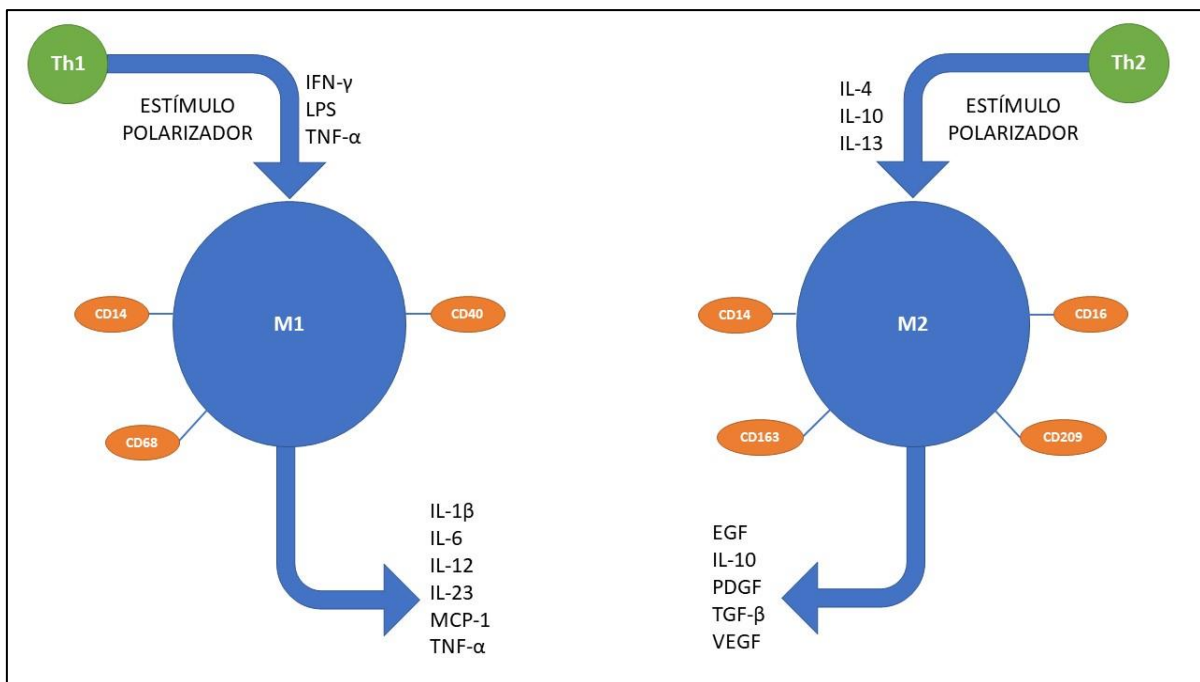


Figura 1 - Estímulos polarizadores, expressões de moléculas de membrana e citocinas produzidas pelos macrófagos M1 e M2. EGF: “epidermal growth factor”; IFN: interferon; IL: interleucina; LPS: lipopolissacarídeo; MCP: “monocyte chemoattractant protein”; PDGF: “platelet-derived growth factor”; TNF: “tumor necrosis factor”; TGF: “transforming growth factor”; VEGF: “vascular endothelial growth factor”

Este amplo espectro de funções promotoras para o desenvolvimento e progressão tumoral é consistente com diversos estudos clínicos que demonstram a alta densidade dos macrófagos M2 em neoplasias com prognóstico desfavorável e alto índice de metástases^{69,75,76,77,78}.

No melanoma, marcadores de macrófagos M2, como o CD163, foram implicados em prognóstico desfavorável. O CD163 foi identificado predominantemente na periferia do tumor em ratos, sugerindo um possível mecanismo de metástase através de via hematogênica e linfática. Além disso, tumores com depleção de CD163 cursaram com maior número de células

CD4+ e CD8+ e regressão tumoral^{78,79}, sendo que a relação linfócito/monócito de pelo menos 1,7 foi associada com melhora da sobrevida⁸⁰.

No câncer pancreático, por exemplo, os macrófagos M2 estariam presentes nos linfonodos de drenagem antes mesmo da invasão neoplásica e alterariam o microambiente linfonodal com produção local de VEGF-C, com conseqüente linfangiogênese facilitando a metástase por via linfática⁸⁰.

2.8. Macrófagos M2 do ambiente tumoral nas neoplasias linfoides

Ainda são poucos os trabalhos na literatura que enfocam o papel dos TAMs na evolução e prognóstico das neoplasias linfoproliferativas.

No linfoma B difuso de grandes células, o número de TAMs que coexpressam as moléculas CD68 e CD163 correlaciona-se com curso clínico desfavorável dos pacientes^{82,83}.

No linfoma folicular de células B, é descrito que a relação entre a presença de macrófagos M2 que expressam CD163 e a proliferação angiogênica nas regiões interfoliculares correlaciona-se ao pior prognóstico^{76, 84}.

Zaki et al.⁸⁵ consideram os macrófagos M2 como fatores promotores no linfoma de Hodgkin clássico. Essa população macrofágica também se relaciona com o prognóstico do linfoma de Hodgkin clássico na faixa pediátrica⁸².

Nos linfomas T, o papel dos macrófagos M2 tem sido foco de estudos. A taxa de macrófagos M2 nas lesões guarda relação com o pior prognóstico no linfoma T angioimunoblástico e pode ser considerada um marcador prognóstico dessa condição neoplásica^{86,87}. No linfoma/leucemia de células T do adulto, os TAMs estão associados a evolução neoplásica, sendo demonstrado que há ocorrência de interação entre linfócitos neoplásicos e macrófagos M2, o que poderia representar um alvo terapêutico para essa condição linfoproliferativa/leucêmica⁸⁸.

O número de macrófagos CD163+ no microambiente tumoral do linfoma cutâneo de células T é maior do que na pele normal. Além disso, a taxa de TAMs correlaciona-se com o pior prognóstico. Após tratamento tópico com corticosteroides e luz ultravioleta, verifica-se

diminuição do número de M2 nas lesões. A molécula CD163 solúvel também está aumentada no soro dos pacientes com doença em comparação com o grupo controle⁸⁹.

A ação angiogênica dos TAMs na promoção da progressão neoplásica é corroborada pela diminuição concomitante da expressão das moléculas CD31 e podoplanina durante a depleção de macrófagos CD163+, o que retardaria o crescimento de linfomas cutâneos de células T⁹⁰.

Furudate et al.⁹¹ avaliaram a densidade de TAMs nos diferentes estágios da lesão cutânea da MF. Macrófagos CD206+, considerados macrófagos M2, aumentam em número à medida que as lesões progridem. Os autores também identificaram a interação da periostina do estroma tumoral com os TAMs.

Com base nos poucos trabalhos disponíveis na literatura, podemos resumir que, no linfoma cutâneo de células T, os macrófagos sofreriam polarização para macrófagos M2 devido ao microambiente de citocinas liberadas pelos linfócitos neoplásicos. Por outro lado, os TAMs promoveriam a angiogênese e fatores inibidores da imunidade celular contra as células tumorais, favorecendo a progressão tumoral⁹².

2.9. Macrófagos M2 e terapêutica alvo nos processos linfoproliferativos

Diversos estudos têm demonstrado a ação dos TAMs como fatores pró-tumorais importantes. Por isso, algumas terapias anti-macrofágicas foram desenvolvidas, tanto em monoterapia quanto associadas a outras estratégias terapêuticas^{93,94}.

Como exemplo de monoterapia, tem-se a inibição do "colony stimulating factor 1 receptor" (CSF-1R), que, em vários tipos de tumores, provou-se eficaz ao impedir o crescimento de células de adenocarcinoma ductal pancreático⁹³ e ao induzir regressão de glioblastoma multiforme⁹⁴.

A terapia anti-macrofágica associada a outras terapias, como quimioterapia, radioterapia ou inibidores angiogênicos, alcança respostas terapêuticas mais efetivas e duráveis, provando a importância do estudo dos TAMs no microambiente das neoplasias, entre elas as linfoproliferativas⁹⁵.

Fármacos como talidomida e lenalidomida inibem a infiltração de macrófagos e reduzem tumores, enquanto anti-VEGF-A e avastin/bevacizumabe atuam contra angiogênese induzida por macrófagos¹⁶. Bexaroteno tem efeitos terapêuticos parcialmente atribuídos à supressão da produção de CCL22 por macrófagos M2. A expressão de CD30 sugere o uso do anticorpo monoclonal Brentuximab vedotina como alvo. Anticorpos monoclonais bloqueando a proteína de morte celular programada (PD1) e seu ligante (PDL1) reduzem o crescimento tumoral e melhoram a ativação de células T^{16,96}.

A conversão de macrófagos M2 em M1 também tem objetivo terapêutico, com ativadores de receptores do tipo “Toll” propostos como estratégia^{16,97}. Paclitaxel estimula macrófagos M1, aumentando a citotoxicidade tumoral¹⁶.

Embora os detalhes moleculares da interação celular entre os macrófagos do ambiente tumoral e as células linfoides neoplásicas ainda não estejam totalmente esclarecidos, a caracterização fenotípica e quantificação da população dos TAMs nos processos linfoproliferativos é uma abordagem útil e essencial para a avaliação clínica e prognóstica desse grupo de neoplasias⁹⁸.

Além disso, a modulação do microambiente e consequente supressão do crescimento tumoral configura-se como alternativa de estratégia imunoterápica para o tratamento dos linfomas T cutâneos^{16,70,98,99}.

2.10. Identificação de macrófagos M2 nos tecidos

Os macrófagos podem ser identificados pela sua função, expressão de fatores de transcrição, marcadores de superfície celular e produção de citocinas.

Os macrófagos M2 expressam altos níveis dos antígenos CD163 (“hemoglobin scavenger receptor”), CD204, CD206 e “stabilin-1” em sua superfície celular, além de produzirem IL-10, IL-12, VEGF, TGF- β , arginase e metaloproteínas⁷⁷.

A molécula CD163 é considerada como marcador específico dos macrófagos associados aos tumores, sendo amplamente utilizado em cortes histológicos de material fixado e embebido em parafina^{77,101,102}.

Os fatores de transcrição são marcadores que podem auxiliar a diferenciar os subtipos de macrófagos. O fator de transcrição "musculoaponeurotic fibrosarcoma proto oncogene" (c-MAF) é considerado marcador de macrófagos M2, pois é fator de transcrição para a produção de IL-10^{84,102}. Por outro lado, os macrófagos M1 expressam o fator de transcrição STAT1, frente aos interferons de tipo 1, 2 e 3 e sua forma fosforilada (p-STAT1) liga-se à região promotora de genes estimulados por IFN- γ ⁸⁴. Com isso, é proposto identificar as subpopulações de macrófagos através de dupla marcação imuno-histoquímica das moléculas CD68 e CD163 e o fator de transcrição STAT1 e c-MAF, sendo o c-MAF expresso nos macrófagos M2 (CD68+c-MAF+ e CD163+c-MAF+).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo primário (objetivo geral)

Identificar e quantificar a presença de macrófagos M2 no microambiente das lesões de pele de pacientes com MF e SS, com e sem comprometimento linfonodal, a fim de verificar a relação dessa população celular com o prognóstico e a progressão da doença, evidenciada pelo comprometimento extracutâneo (linfonodal).

3.2. Objetivos secundários (objetivos específicos)

Analisar as características clínico-evolutivas e histopatológicas do grupo de pacientes com MF e SS.

Demonstrar e quantificar o número de macrófagos M2 nas lesões de pele de pacientes com MF e SS, com e sem comprometimento linfonodal, em três fases de acompanhamento clínico-histopatológico: inicial (ao diagnóstico), intermediária (tempo mais próximo à mediana de acompanhamento em que foi realizada coleta de biópsia de pele) e ao desfecho (última intervenção ou atendimento).

Comparar a população de macrófagos M2 da pele dos pacientes com MF e SS que tiveram linfonodos comprometidos com a daqueles sem envolvimento linfonodal.

Demonstrar e quantificar o número de macrófagos M2 nas lesões de pele de pacientes com outras dermatoses de etiologia inflamatória, a fim de compará-lo com o grupo de estudo.

4. CASUÍSTICA E MÉTODOS

O projeto foi inicialmente submetido e aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (Certificado de Apresentação e Certificação Ética 79177517.2.0000.0068), conforme Anexo 2. O estudo realizado foi observacional, retrospectivo de coorte.

4.1. Casuística

A casuística abrangeu amostras de biópsias de lesões de pele de pacientes com suspeita diagnóstica ou diagnóstico comprovado de micose fungoide e síndrome de Sézary, que tiveram ou não linfonodo ressecado para estadiamento. Além disso, como grupo controle, foram avaliados espécimes de pele e linfonodos retirados de pacientes com eritrodermia, que durante a avaliação clínico-laboratorial e evolutiva do processo, o diagnóstico não resultou em MF ou SS.

Os espécimes de pele foram selecionados a partir dos arquivos do Laboratório de Dermatopatologia da Divisão de Clínica Dermatológica, e os espécimes de linfonodo dos arquivos da Divisão de Anatomia Patológica (DAP), ambos do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

As biópsias de pele foram realizadas, em sua maioria, por "punch" sob anestesia local, em mais de uma topografia afetada pela lesão. As amostras, assim que obtidas, foram imediatamente fixadas em formol tamponado a 10%.

As amostras de linfonodos foram obtidas preferencialmente por exérese cirúrgica. Os linfonodos retirados para avaliação anatomopatológica, de acordo com os dados dos prontuários e fichas de requisição, apresentavam diâmetro igual ou maior de 1,5 cm ou mostravam-se irregulares, endurecidos, fixos ou formando conglomerados à palpação.

Os dados clínicos, epidemiológicos e laboratoriais relevantes dos pacientes foram obtidos das fichas de requisição de exame anatomopatológico e por consulta de seus prontuários. Todas as informações clínicas foram avaliadas e verificadas com o auxílio de um médico dermatologista do Grupo de Linfomas Cutâneos da Divisão de Clínica Dermatológica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Os pacientes foram estadiados segundo Classificação Modificada ISCL/EORTIC^{20,60}.

Devido ao fato de a doença apresentar, na maioria dos casos, um desenvolvimento insidioso e progressão lenta, o estudo abrangeu três momentos durante o acompanhamento clínico-laboratorial até o último atendimento do paciente, nos quais foram realizadas biópsias de pele e/ou linfonodo para análise: a admissão na Divisão de Clínica Dermatológica; tempo intermediário, sendo aquele mais próximo à mediana de acompanhamento em que foi realizada coleta de biópsia de pele; e tempo final, no qual ocorreu o último atendimento registrado no serviço. As informações foram organizadas e catalogadas em planilhas eletrônicas para análise, conforme demonstrado no Quadro 4:

Quadro 4 - Informações coletadas para análise

Sumário de dados coletados
<ul style="list-style-type: none"> • Código de identificação; • Idade; • Data de admissão, de atendimento intermediário e final; • Idade na admissão, no atendimento intermediário e final; • Estadiamento na admissão, no atendimento intermediário e final; • Codificação do exame anatomopatológico de pele na admissão, no atendimento intermediário e final; • Codificação do exame anatomopatológico de linfonodo na admissão, no atendimento intermediário e final; • Diagnóstico anatomopatológico e imunohistoquímico na admissão, no atendimento intermediário e final; • Desfecho [morto com evidência de doença (MCED) ou vivo com evidência de doença (VCED)]; • Diagnóstico multidisciplinar final; • Comorbidades.

MCED: morto com evidência de doença; VCED: vivo com evidência de doença

Foram obtidas 187 amostras de pele e linfonodo de 58 pacientes. Essas amostras foram catalogadas e organizadas em uma tabela que qualificou e quantificou os materiais disponíveis para análise, além de resumir os diagnósticos histopatológicos de cada material.

De cada paciente, foram levantadas várias amostras de pele possíveis de serem analisadas de acordo com a quantidade de material e sua qualidade.

4.2. Análise histopatológica

Os espécimes de pele e linfonodo, corados com hematoxilina e eosina, e os preparados submetidos às técnicas de imunohistoquímica realizadas por ocasião dos diagnósticos dos

pacientes foram revisados. A partir dessa revisão, ampliou-se os painéis de marcadores imunofenotípicos sempre que necessário para a melhor análise do material.

A revisão histopatológica dos espécimes de pele foi realizada de acordo com o protocolo histopatológico proposto por Guitart et al.¹², como demonstrado no Quadro 5:

Quadro 5 - Critérios histológicos para a diagnose da micose fungoide

I. CRITÉRIOS MAIORES

Exame ao menor aumento: densidade celular

- 0 – Infiltrado celular escasso;
- 1 – Infiltrado perivascular superficial leve;
- 2 – Infiltrado perivascular moderado ou infiltrado em banda sem espessamento da derme papilar;
- 3 – Infiltrado confluyente denso com espessamento da derme papilar e envolvimento da derme reticular.

Exame ao aumento médio: epidermotropismo

- 0 – Ausente;
- 1 – Epidermotropismo da camada basal focal (4 ou mais linfócitos alinhados ao longo da camada basal), um microabscesso de Pautrier (4 ou mais linfócitos agrupados e envoltos por com halo claro) ou agrupamentos de 2 ou 3 linfócitos na epiderme sem espongiose;
- 2 – Epidermotropismo extenso ao longo da camada basal e/ou dois ou mais microabscessos de Pautrier;
- 3 – Epidermotropismo acentuado com maior número de linfócitos que queratinócitos na camada basal da epiderme.

Exame ao maior aumento: atipia de linfócitos

- 0 - Ausência de linfócitos atípicos;
- 1 - Atipia leve (linfócitos pequenos e médios);
- 2 - Atipia moderada (linfócitos pequenos, médios e grandes);
- 3 - Infiltrado uniforme de células atípicas ou o pleomórficas, figuras de mitose abundantes, poucos linfócitos pequenos reativos. A maioria dos linfócitos médios e grandes.

continua

Quadro 5 - Critérios histológicos para a diagnose da micose fungoide (conclusão)

II. CRITÉRIOS MENORES:

- 1 - Fibroplasia da derme papilar – colágeno denso envolvendo células isoladas;
- 1 - Atipia de linfócitos epidérmicos leve (baixo grau) ;
- 2 - Atipia de linfócitos epidérmicos alto grau;
- 1 - Infiltrado linfocitário **não associado** a alterações inflamatórias (edema, infiltrado misto com polimorfonucleares neutrófilos e eosinófilos, espongiose, tumefação endotelial e marginação de células inflamatórias nos vasos dérmicos).

Escore (soma dos pontos):

- 0 – 2** – Dermatites de interface/perivasculares ou outras;
- 3 – 4** – Infiltrado linfoide atípico; não excluído MF;
- 5 – 6** – Infiltrado linfoide atípico sugestivo de MF;
- 7 ou mais** – micose fungoide.

FONTE: Guitart et al.¹²

MF: micose fungoide; SS: síndrome de Sézary

4.3. Técnicas imunohistoquímicas para avaliação imunofenotípica do processo linfomatoso

Os espécimes de pele e linfonodo foram avaliados e revisados utilizando-se marcadores imunofenotípicos para o diagnóstico de linfomas cutâneos de células T (conforme a Tabela 1) e revelados com o cromógeno diaminobenzidina (DAB).

Tabela 1 - Anticorpos do painel imunofenotípico utilizado no estudo de linfomas (pele e linfonodo), código/clones, procedência e diluição

Antígeno	Código/clone	Procedência	Diluição
CD3	MRQ-39	Merck KGaA, Darmstadt, Germany	1:2000
CD20	L-26	Merck KGaA, Darmstadt, Germany	1:2000
CD21	EP3093	Merck KGaA, Darmstadt, Germany	1:20.000
CD4	SP35	ABCAM, Cambridge, UK	1:800
CD8	C8/144B	Dako, California, USA	1:500
CD7	MRQ-56	Merck KGaA, Darmstadt, Germany	1:200
CD30	BER-H2	Merck KGaA, Darmstadt, Germany	1:100
CD68	PGM1	ABCAM, Cambridge, UK	1:1000
Antígeno Ki67	SP6	ABCAM, Cambridge, UK	1:1000
CD2	MRQ-11	Merck KGaA, Darmstadt, Germany	1:500
CD5	4C7	Merck KGaA, Darmstadt, Germany	1:2000

NOTA: CD: Cluster de diferenciação

Para complementar a análise imunofenotípica das amostras de pele e realizar as reações de dupla marcação, foram obtidos cortes histológicos de três µm de espessura, a partir de

material embebido em parafina, e colhidos em lâminas previamente preparadas com solução adesiva de 3 amino-propyltriethoxy-silane (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) a 2%.

Com o objetivo de economizar insumos e obter uma melhor homogeneização das reações imunohistoquímicas entre as amostras, foram dispostos dois a três cortes histológicos de amostras diferentes em cada lâmina silanizada. A identificação dos cortes e sua posição em cada lâmina foram organizadas conforme a Figura 2.



Figura 2 - Ilustração da disposição dos cortes histológicos de amostras de pele de diferentes pacientes a serem submetidas às técnicas de imunohistoquímica

As amostras que precisaram de ampliação do painel imunohistoquímico para complementação diagnóstica foram imunomarcadas de forma automatizada na DAP do HCFMUSP, utilizando o protocolo Ventana Benchmark Ultra (Roche- Ventana, Tucson, EUA).

4.4. Técnica imunohistoquímica de dupla marcação para marcação de macrófagos de fenótipo M2

Uma vez que há controvérsias na literatura, anteriormente relatadas, quanto aos marcadores de macrófagos M2, foram utilizados anticorpos CD163 (marcador de membrana/citoplasma) e fator de transcrição c-MAF (fator de transcrição nuclear de IL10) para identificar macrófagos M2. Para isso, foi realizada a técnica de dupla marcação, seguindo o protocolo proposto por Barros et al.⁸⁴. Os anticorpos utilizados encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2 - Pannel de anticorpos proposto para identificação de macrófagos M2

Antígeno	Código/clon	Procedência	Diluição
CD163	NCL-L-CD163	Leica Biosystems, Newcastle Upon Tine, UK	1:100
c-MAF (M-153)	SC7866	Santa Cruz Biotechnology, California, EUA	1:400

NOTA: CD: cluster de diferenciação; c-MAF: fator de transcrição “musculoaponeurótico fibrossarcoma c”

A técnica utilizada para a realização da dupla marcação se assemelha à técnica de imunohistoquímica habitual. O protocolo empregado é o mesmo até a etapa em que o anticorpo primário é aplicado¹⁰³.

Os cortes histológicos foram desparafinados em dois banhos de xilol, um de 20 minutos e outro de 10 minutos, ambos à temperatura ambiente. Em seguida, os espécimes foram hidratados em uma bateria decrescente de etanol (100%, 95% e 70%) e lavados em água corrente por cinco minutos. Foi feito o bloqueio de peroxidase endógena em uma câmara escura com três incubações em água oxigenada 3%, cada uma com duração de 10 minutos.

Após esse processo, as lâminas foram lavadas em água corrente durante cinco minutos e submetidas a tratamento para exposição dos sítios antigênicos em calor úmido, em banho-maria a 95°C, sendo imersas na solução Target Retrieval Solution pH 9,0 (cód. S2367, Dako, California, USA), por 20 minutos. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água corrente e água destilada por cinco minutos cada e submersas em solução salina tamponada com fosfatos (PBS) pH 7,4.

A seguir, fez-se o bloqueio de proteínas inespecíficas do tecido com incubação em solução de leite desnatado Molico® (Nestlé, Vevey, Suíça) a 10% durante 30 minutos, à temperatura ambiente.

Após a lavagem das lâminas em PBS pH 7,4 por duas vezes, foi realizada a incubação com o anticorpo primário anti-CMAF (SC-7866, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), diluído em soroalbumina bovina (BSA) fração V (cód. 119030, SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Germany) 1% na diluição 1:400, e acrescido de azida sódica 0,1% em PBS pH 7,4, "overnight" a 4°C. As lâminas foram, então, lavadas novamente em PBS pH 7,4 por duas vezes, durante cinco minutos cada, e procedeu-se à incubação com o anticorpo pós-primário (Novolink Max Polymer Detection System, cód. K0690, Leica Biosystems, Newcastle Upon Tine, UK) pronto para uso, em câmara úmida, durante 30 minutos à temperatura

ambiente. Em seguida, as lâminas foram lavadas em PBS pH 7,4, por duas vezes, durante cinco minutos cada e incubadas com o polímero (Novolink Max Polymer Detection System, cód. RE7280-K, , Leica Biosystems, Newcastle Upon Tine, UK) pronto para uso, em câmara úmida durante 30 minutos a temperatura ambiente.

A revelação dos sítios de ligação do marcador nuclear c-MAF foi feita com solução cromogênica de diaminobenzidina (3,3'-diaminobenzidine, cód. D5637, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) na concentração de 0,03%, acrescida de 1,2 ml de água oxigenada 3%.

Em uma segunda etapa, as lâminas foram lavadas em água corrente por cinco minutos e, posteriormente, em PBS pH 7,4. Em seguida, foram incubadas com o anticorpo primário anti-CD163 (NCL-CD163, Leica Biosystems, Newcastle Upon Tine, UK), diluído em 1:100, "overnight" a 4°C.

Na sequência, lavou-se o material em PBS pH 7,4, por duas vezes, durante cinco minutos cada, e incubou-se com o reagente "complement" do sistema "Reveal - Biotin-Free Polyvalent DAB" (cód. SPD125, ABCAM, Cambridge, UK) pronto para uso, em câmara úmida, por 30 minutos a 37°C. Após nova lavagem em PBS, foi realizada uma incubação com "horseradish (HRP) conjugate" do sistema "Reveal", por 30 minutos a 37°C.

Para a etapa de revelação dos sítios antigênicos do marcador citoplasmático/membranoso CD68 foi utilizada a solução cromógena TrueBlue Peroxidase substrate (cód. 71-00-64, KLP, Gaithersburg, USA), pronta para uso.

Em seguida, as lâminas foram lavadas em água destilada por dois minutos e secas à temperatura ambiente, sendo que os cortes histológicos foram cobertos com resina Permunt (cód. SP15-100, Thermo Fisher Scientific, MA, USA) e lamínulas de vidro.

Durante o processo, foram utilizados controles positivos e negativos para atestar a fidelidade das reações. Para os controles negativos, o anticorpo primário foi omitido e substituído por anticorpo isotípico não reagente para os antígenos em estudo. Já para os controles positivos, foram utilizados fragmentos de pele com hanseníase virchowiana e placenta como referência.

4.5. Análise de risco e medidas de proteção

Não houve risco para os pacientes, uma vez que a casuística do projeto compreende espécimes de biópsias de pele e linfonodo coletados previamente por ocasião do diagnóstico, estadiamento e seguimento dos pacientes.

Os materiais utilizados foram adequadamente armazenados conforme a legislação vigente. Os cortes histológicos não utilizados ficaram à disposição da instituição.

O descarte de reagentes utilizados nos processamentos técnicos que possam ser danosos ao meio ambiente foi realizado de acordo com as normas estabelecidas pelas instituições envolvidas.

4.6. Quantificação das células imunomarcadas

As lâminas das reações de dupla marcação foram digitalizadas pelo “scanner” 3DHISTECH (Budapeste, Hungria) e visualizadas pelo software Case Viewer da mesma empresa. A digitalização das lâminas foi necessária e importante devido ao curto tempo em que o cromógeno azul sofre esmaecimento, prejudicando a avaliação. As imagens obtidas foram armazenadas na nuvem e em discos rígidos externos para posterior revisão e análise.

Os painéis imunohistoquímicos foram avaliados em microscopia óptica convencional e posteriormente comparados às descrições dos laudos originais. Para tornar os resultados mais reprodutíveis na prática, a quantificação da imunomarcagem foi expressa em uma escala de 0 a 5 cruzes, conforme demonstrado no Quadro 6.

Quadro 6 - Escore para avaliação imunohistoquímica de marcadores linfomatosos

Escore	Porcentagem de positividade
0	0 a 0,9%
1+	1 a 20%
2+	21 a 40%
3+	41 a 60%
4+	61 a 80%
5+	81 a 100%

A análise morfométrica da dupla marcação foi realizada diretamente no aplicativo "Case Viewer" após tratamento de imagem para melhor definição da marcação. Para cada caso, foram selecionados cinco campos de $200.000 \mu\text{m}^2$ na derme, onde havia maior concentração de células com dupla imunomarcagem ("hotspots"), totalizando 1 mm^2 (ver Figura 3). As células com dupla marcação inequívoca (nuclear e citoplasmática) foram marcadas e quantificadas conforme mostrado na Figura 4.



Figura 3 - Seleção de campos microscópicos para análise. Os campos foram selecionados eletronicamente na imagem escaneada totalizando-se cinco campos de $200.000 \mu\text{m}^2$

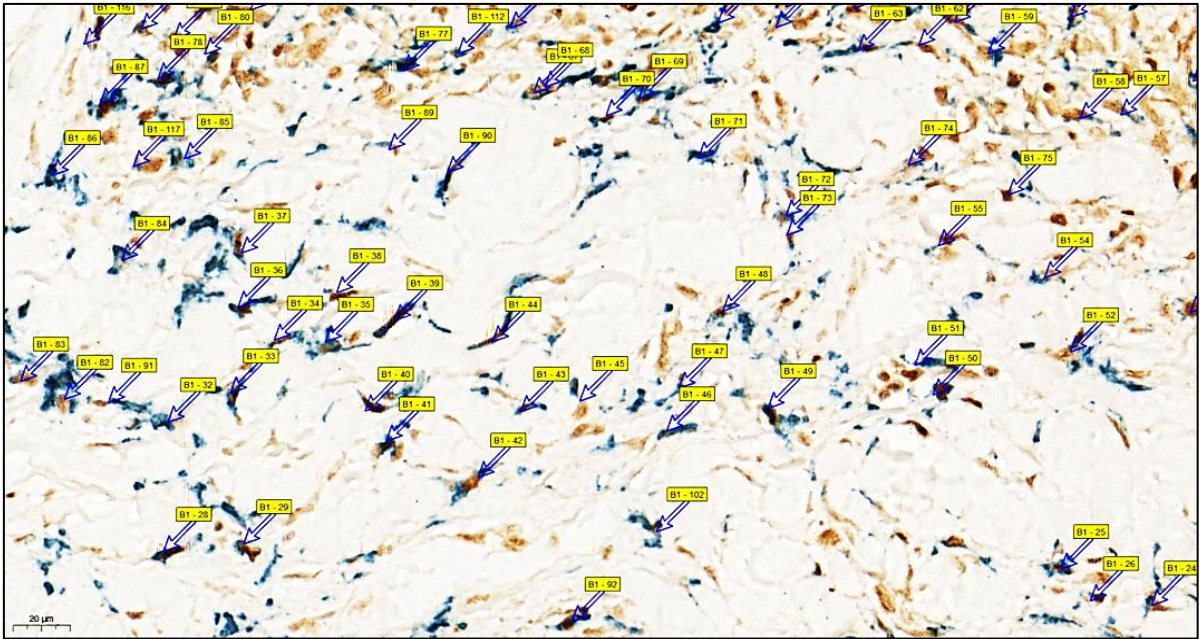


Figura 4 - Marcação e contagem das células com dupla imunomarcagem. As células foram assinaladas através de aplicativo com contagem final do número absoluto de células imunomarcadas por área de 1mm^2

Para manter a fidedignidade da análise morfométrica, alguns casos específicos foram tratados da seguinte maneira:

- Células com dupla imunomarcagem positiva nos limites do campo de contagem foram consideradas apenas se o núcleo marcado estivesse dentro do campo de contagem. Células exibindo apenas marcação citoplasmática no campo em análise foram excluídas (ver Figura 5).
- Células com múltiplas marcações nucleares sobrepostas e compartilhando apenas uma marcação citoplasmática foram consideradas como uma única contagem, devido à possibilidade de ser um macrófago multinucleado.
- Áreas com impregnação heterogênea e inespecífica de cromógenos foram excluídas da contagem.
- Um caso de cútis laxa granulomatosa não foi submetido à contagem devido à intensa marcação imunohistoquímica.

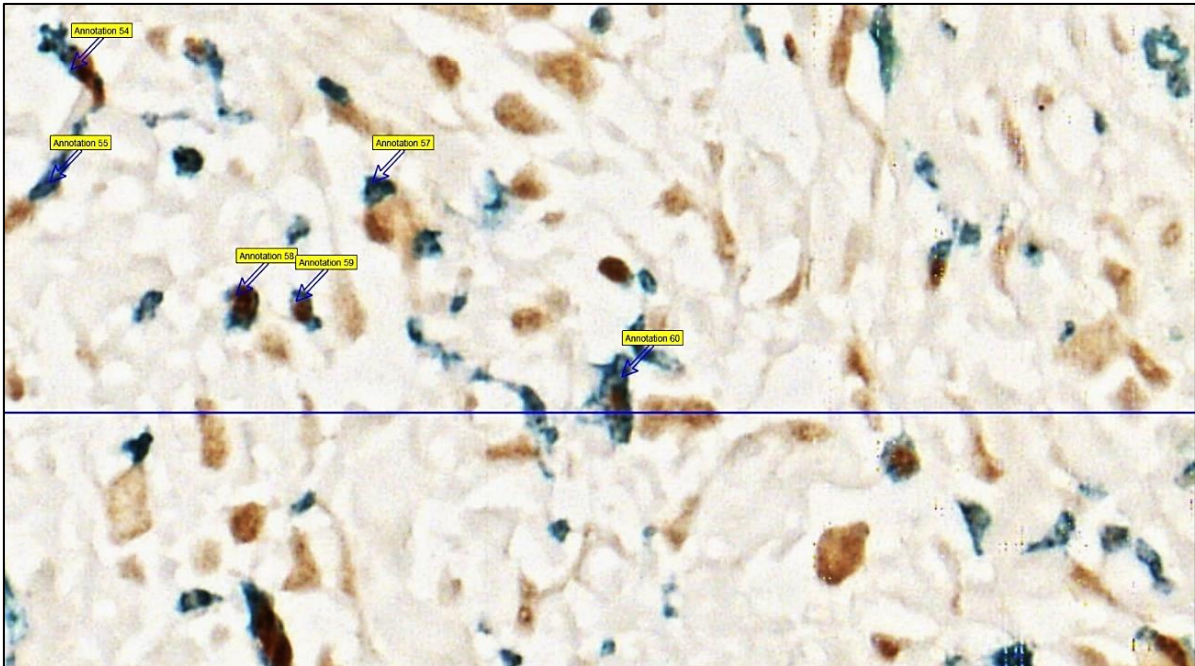


Figura 5 - Tratamento de caso específico de dupla marcação imunohistoquímica em que a célula com dupla imunomarcção encontra-se no limite do campo de contagem. Como ambas as marcações se encontram dentro do campo selecionado, esta célula foi adicionada à contagem

Os resultados da análise morfométrica foram expressos em número de células imunomarcadas por mm^2 para posterior análise estatística.

4.7. Critérios de não inclusão de pacientes e amostras no estudo

Após a seleção dos casos e revisão das amostras coletadas foram excluídos da casuística do estudo:

- Pacientes com diagnóstico final de linfoma diferente de MF e SS.
- Pacientes sem conclusão diagnóstica multidisciplinar.
- Pacientes com outras comorbidades relevantes, principalmente histórico oncológico de linfoma.
- Amostras com material esgotado em bloco de parafina.
- Cortes histológicos com área avaliável menor que 1 mm^2 .
- Reações não fidedignas (com controles inadequados para análise).
- Reações com impregnação inespecífica dos cromógenos.

4.8. Grupos de análise

Para fins de análise, os pacientes foram divididos em quatro grupos, levando em consideração o estadiamento e o diagnóstico final:

1. Pacientes com dermatose inflamatória ou idiopática (com biópsia de linfonodo).
2. Pacientes com MF/SS sem acometimento nodal (com biópsia de linfonodo).
3. Pacientes com MF/SS com acometimento nodal (com biópsia de linfonodo).
4. Pacientes com MF/SS com acometimento nodal incerto (sem biópsia de linfonodo).

Apesar de não alterar o estadiamento da doença, a presença de clonalidade (N1b) foi relacionada a um pior prognóstico, podendo demonstrar o acometimento precoce do linfonodo⁴². Dessa forma, aqueles pacientes com estadiamento N1b a N3 foram agrupados como tendo acometimento nodal para fins de análise.

Pacientes que não foram submetidos à biópsia de linfonodo foram considerados somente nas análises exclusivas da pele, sem relação com o “status” nodal.

O diagnóstico final foi multidisciplinar e considerou dados clínicos, histopatológicos, moleculares e evolutivos até o fim do acompanhamento.

4.9. Análise estatística

As variáveis obtidas foram organizadas em tabelas para análise de colunas, aninhadas e de contingência.

Todas as variáveis foram submetidas ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Aquelas que seguiram uma distribuição normal foram consideradas para análises paramétricas, enquanto aquelas que não seguiram foram consideradas para análises não paramétricas.

As variáveis quantitativas paramétricas foram expressas em médias com desvio-padrão, enquanto as variáveis qualitativas não paramétricas em medianas com intervalo interquartil de 25% a 75%.

Conforme descrito acima, as variáveis foram organizadas em vários grupos para fins de comparação.

Quando as variáveis eram paramétricas, a comparação foi realizada pelo teste t de Student (comparação de dois grupos) e testes de variância (ANOVA) para avaliação de três

grupos, com múltipla comparação pelo método de Tukey. As variáveis com dados pareados ou repetidos foram analisadas com variações específicas de ANOVA e teste t. Para as variáveis não paramétricas, foram utilizados testes de Mann-Whitney U para comparação entre dois grupos independentes e testes de Wilcoxon para comparação entre dois grupos pareados. Para comparação de três ou mais grupos, foram utilizados testes de Kruskal-Wallis para grupos independentes e Friedman para grupos relacionados, com múltipla comparação pelo método de Dunn.

Avaliou-se a sensibilidade e especificidade da utilização do número de macrófagos M2 na admissão para prever envolvimento linfonodal por meio da curva ROC (receiver operator characteristic curve). Para definição do ponto de corte, foi aplicado o índice de Youden (J).

Para análise de dados categóricos e tabelas de contingência, foram utilizados os testes Qui-quadrado e o Teste Exato de Fisher com intervalo de confiança (IC) de 95%.

As curvas de sobrevida foram obtidas pela metodologia de Kaplan-Meier e comparadas pelo teste de Log-rank (Mantel-Cox).

Considerou-se significância estatística quando o valor de p foi menor ou igual a 0,05.

Todas as análises estatísticas e gráficos foram realizados com o software GraphPad Prism 9.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

5. RESULTADOS

5.1. Caracterização da casuística, estadiamento ao longo do acompanhamento e sobrevida

Foram analisadas 187 amostras de pele e linfonodos de 58 pacientes, bem como seus prontuários, admitidos entre os anos de 1988 e 2022 com diagnóstico suspeito de MF e SS. Deste total, foram excluídos 3 pacientes devido ao não cumprimento dos critérios de inclusão. Dos 55 pacientes restantes (n), 52,7% eram do sexo masculino e 47,3% do sexo feminino, apresentando uma proporção de 1,1M:1F.

Os grupos de análise incluíram 11 pacientes com dermatose inflamatória ou idiopática, 12 com MF/SS sem envolvimento nodal, 26 com MF/SS apresentando envolvimento nodal e 6 com MF/SS com envolvimento nodal incerto (exames clínicos e histopatológicos alterados, porém sem amostragem linfonodal), conforme Tabela 3 e fluxograma na Figura 6.

Tabela 3 - Frequência de sexo distribuída nos grupos de análise

Grupos	Masculino	Feminino	Total
Dermatoses inflamatórias ou idiopáticas	11	0	11 (20%)
MF/SS sem acometimento nodal	3	9	12 (22%)
MF/SS com acometimento nodal	11	15	26 (47%)
MF/SS com acometimento nodal incerto	4	2	6 (11%)
Total	29 (53%)	26 (47%)	55 (100%)

NOTA: SS: síndrome de Sézary; MF: micose fungoide

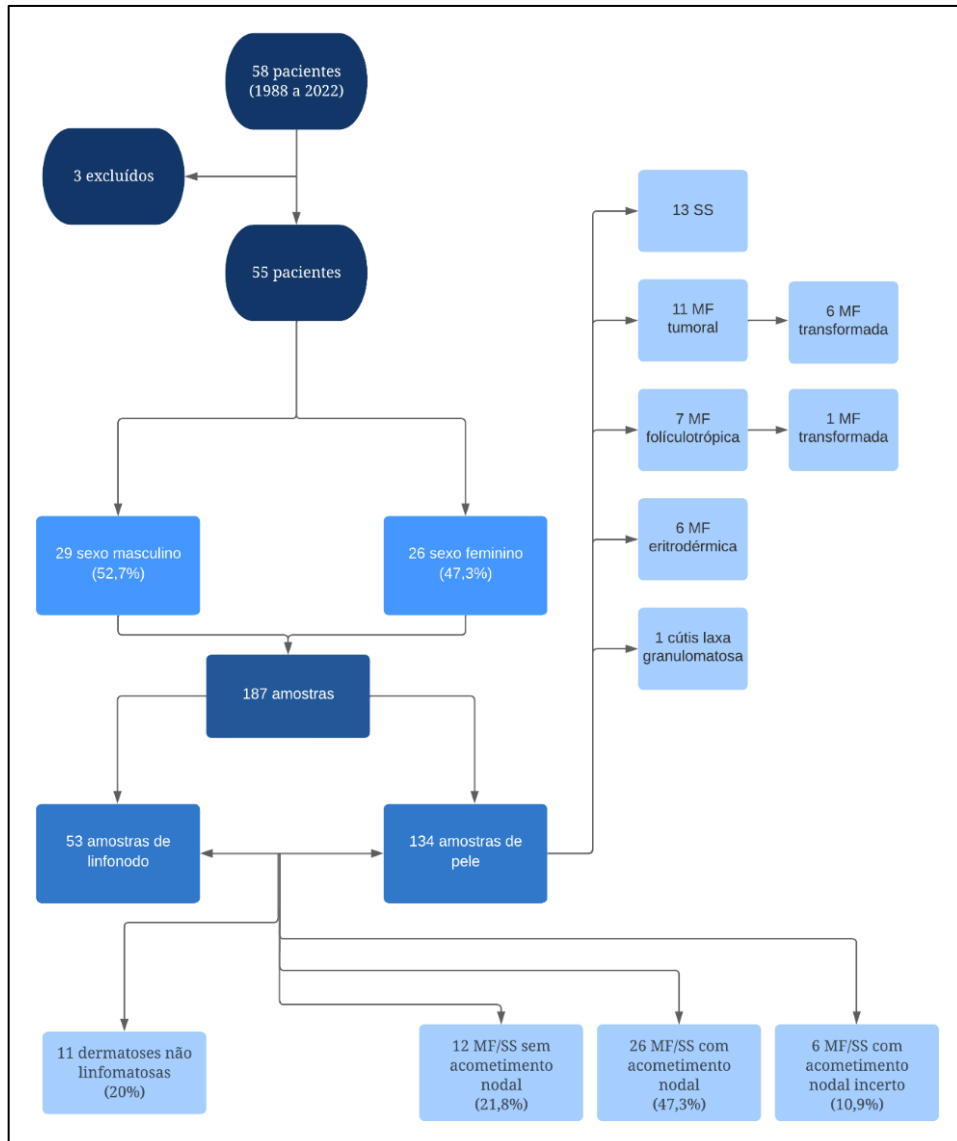


Figura 6 – Casuística. MF: micose fungoide; SS: síndrome de Sézary

Os diagnósticos clínicos e histopatológicos ao desfecho foram síndrome de Sézary em 13 pacientes, micose fungoide tumoral em 11 (sendo seis transformadas), dermatose inflamatória ou idiopática em 11, micose fungoide foliculotrópica em sete (sendo uma transformada), micose fungoide clássica em seis, micose fungoide eritrodérmica em seis e uma cútis laxa granulomatosa. As frequências de diagnósticos ao desfecho por sexo são demonstradas na Tabela 4. Todos os diagnósticos ao desfecho encontram-se na Tabela 1 do Anexo 2.

Tabela 4 - Frequência de diagnósticos ao desfecho por sexo

Diagnóstico	Masculino	Feminino	Total
SS	6	7	13 (24%)
MF tumoral	6	5	11 (20%)
Dermatose inflamatória ou idiopática	11	0	11 (20%)
MF foliculotrópica	2	5	7 (13%)
MF	1	5	6 (11%)
MF eritrodérmica	3	3	6 (11%)
Cutis laxa granulomatosa	0	1	1 (2%)
MF transformada ⁽¹⁾	3	4	7 ⁽¹⁾
Total	29	26	55 (100%)

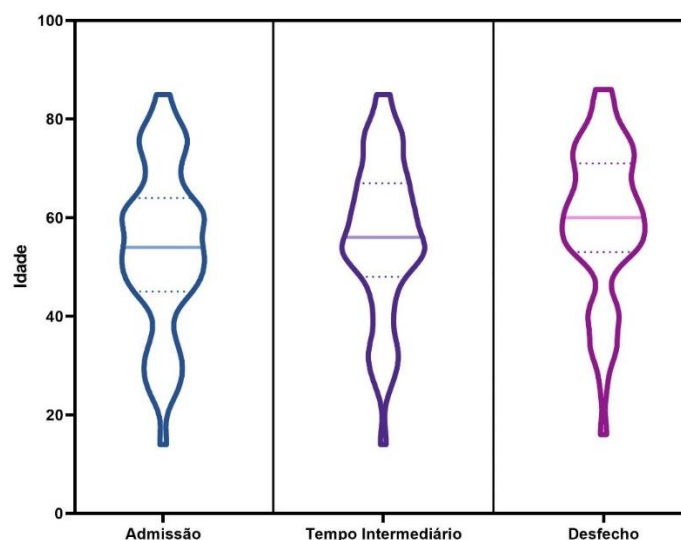
NOTA: ⁽¹⁾ Um caso de MF foliculotrópica e seis casos de MF tumoral tiveram transformação. SS: síndrome de Sézary; MF: micose fungoide

A mediana global da idade dos pacientes na admissão foi de 54 anos e a média de 53,8 anos. No desfecho, a mediana foi de 60 e a média de 59 anos (consultar Gráfico 1). O tempo mediano de acompanhamento foi de 92,5 meses e o total de 279,6 meses.

Na MF a mediana de idade na admissão foi de 53 e a média de 51 anos. No desfecho foi de 58 e 56,6 anos, respectivamente.

Na SS a mediana de idade na admissão foi de 54 e a média de 56,2 anos. No desfecho foi de 58 e 61,8 anos respectivamente.

Gráfico 1 - Comparação da mediana de idade dos pacientes nos três tempos de análise e os respectivos quartis



NOTA: mediana: linha contínua; quartis: linha seccionada. Análise estatística pelo teste de variância ANOVA ($p < 0,001$)

Em relação a evolução do estadiamento, a mediana na admissão foi T2b N1 M0 B0a e, ao final do acompanhamento, foi T3 N1b M0 B0b. Observou-se diferença com significância estatística apenas na comparação entre os grupos analisados na categoria N ($p= 0,038$), conforme demonstrado na Tabela 5 e Gráfico 2.

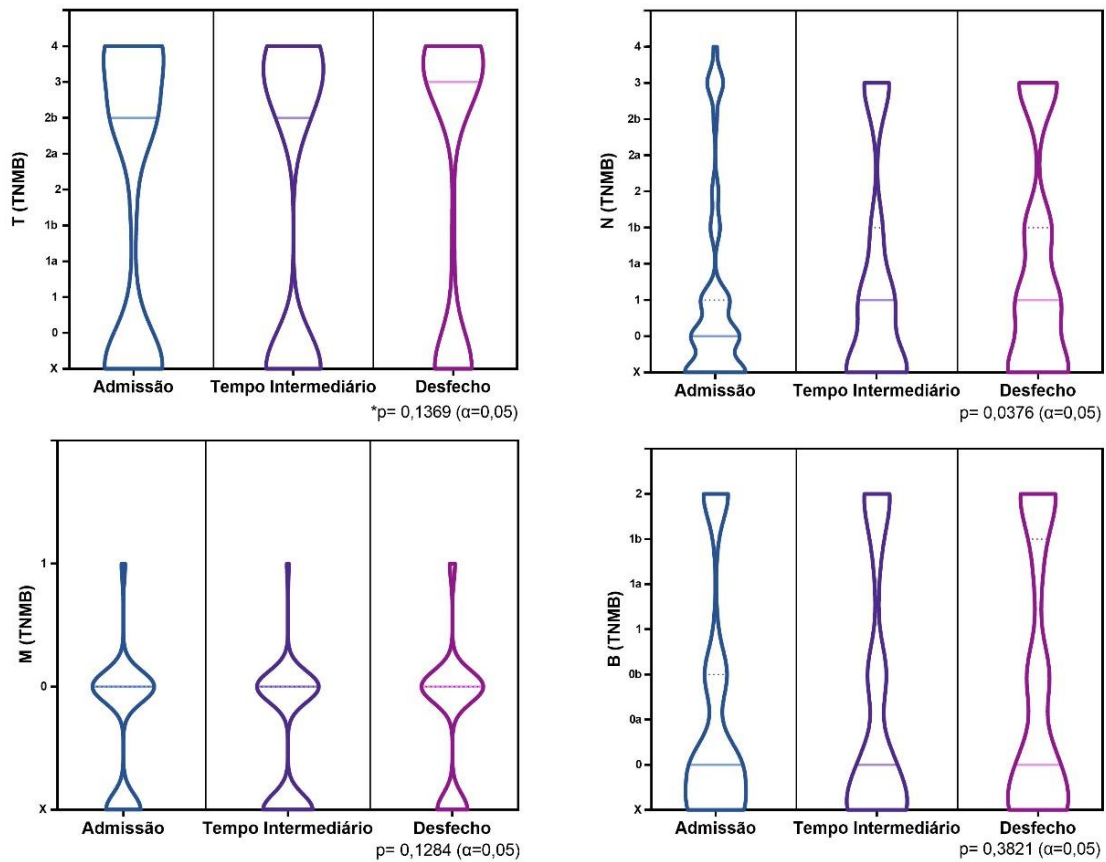
Tabela 5 - Análise comparativa da mediana de estadiamento ISCL-EORTC⁶⁰ ao longo do acompanhamento dos pacientes

Estadiamento	n	Mediana	Quartis (25% e 75%)	Valor-p
Estadio T				
Admissão	55	T2b	T1 - T4	0,137
Tempo Interm.	55	T2b	T1 - T4	
Desfecho	55	T3	T1 - T4	
Estadio N				
Admissão	55	N0	Nx – N1	0,038
Tempo Interm.	55	N1	Nx – N1b	
Desfecho	55	N1	Nx – N1b	
Estadio M				
Admissão	55	M0	Mx – M0	0,128
Tempo Interm.	55	M0	Mx – M0	
Desfecho	55	M0	Mx – M0	
Estadio B				
Admissão	55	B0	Bx – B0b	0,382
Tempo Interm.	55	B0	Bx – B1a	
Desfecho	55	B0	Bx – B1b	

NOTA: Interm.: intermediário; T: tumor; N: linfonodos; M:metástase; B: sangue. Teste de variância ANOVA

O estadiamento dos pacientes durante o acompanhamento encontra-se na Tabela 2 do Anexo 2.

Gráfico 2 - Análise comparativa da mediana do estadiamento ISCL-EORTC⁶⁰ ao longo do acompanhamento dos pacientes e os respectivos quartis



NOTA: mediana: linha contínua; quartis: linha seccionada; T: tumor; N: linfonodos; M: metástases; B: sangue. Análise estatística pelo teste de variância ANOVA

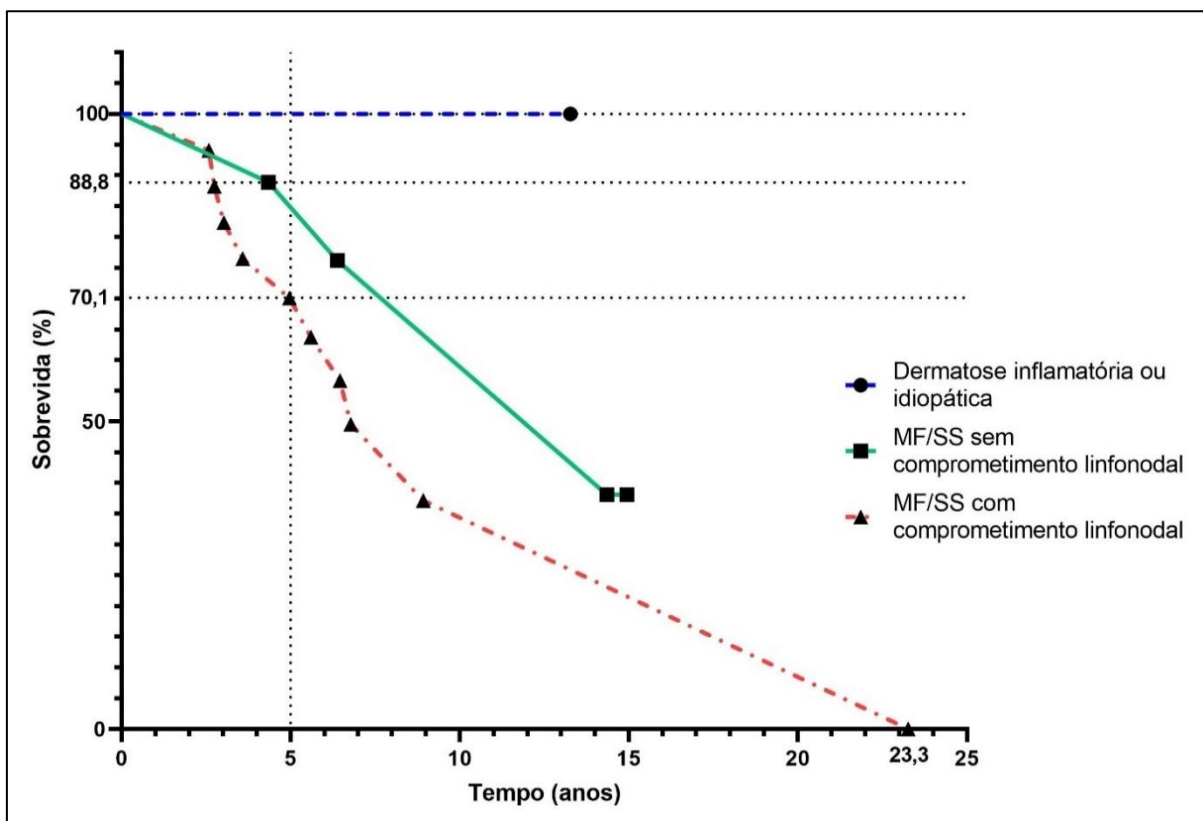
A sobrevida dos pacientes em cinco anos foi de 100% para aqueles com dermatoses inflamatórias ou idiopáticas, 70,1% para aqueles com linfoma e comprometimento linfonodal e 88,8% para aqueles sem comprometimento linfonodal. A mediana de sobrevivência não foi alcançada nos pacientes sem linfoma. Para os pacientes com comprometimento linfonodal, esta foi de 6,78 anos, e para aqueles sem comprometimento linfonodal, foi de 14,3 anos. Não houve diferença estatística entre os três grupos estudados ($p=0,314$), assim como entre os dois grupos de pacientes com linfoma ($p=0,212$). A Tabela 6 e o Gráfico 3 demonstram esses resultados.

Tabela 6 - Análise da sobrevida dos grupos de pacientes em cinco anos

Grupo	Sobrevida em 5 anos	Mediana de sobrevida (em anos)	p-valor
Dermatose inflamatória ou idiopática	100%	NA ⁽¹⁾	0,314
MF/SS sem comprometimento linfonodal	88,8%	14,3	
MF/SS com comprometimento linfonodal	70,1%	6,78	
Razão de risco⁽²⁾ 2,157 (95% IC: 0,71 a 6,57)			

NOTA: ⁽¹⁾ NA: mediana de sobrevida não atingida. ⁽²⁾ Razão de risco entre os grupos com e sem comprometimento nodal. SS: síndrome de Sézary; MF: micose fungoide. Teste de Mantel-Cox

Gráfico 3 - Curvas de sobrevida de acordo com os grupos de análise



MF: micose fungoide; SS: síndrome de Sézary. curva do tipo Kaplan-Meier

5.2. Análise histopatológica e imunohistoquímica

A Tabela 7 demonstra o diagnóstico histopatológico à admissão e o diagnóstico final dos doentes que tiveram o seguimento nos três momentos da observação: admissão, tempo intermediário e desfecho. Nos casos de SS, os diagnósticos anatomopatológicos e imunohistoquímicos iniciais de dermatites foram mais frequentes em comparação com os demais. A MF foliculotrópica foi a variante em que se observou melhor concordância entre a avaliação inicial e o diagnóstico final. Todos os diagnósticos encontram-se disponíveis na Tabela 1 do Anexo 2.

Tabela 7 - Análise comparativa entre os diagnósticos na admissão e o diagnóstico final de pacientes com micose fungoide e síndrome de Sézary

Diagnósticos na admissão	Diagnósticos finais						Total
	MF	MFF	MFT	MFE	CLG	SS	
"Linfoma T periférico"	2	0	2	3	0	0	7 (18,4%)
"Sugestivo de MF"	1	0	1	2	0	1	5 (13,2%)
"Compatível com MF"	2	0	2	0	0	5	9 (23,7%)
"MF foliculotrópica"	0	4	3	0	0	0	7 (18,4%)
"MF transformada"	0	0	1	0	0	0	1 (2,6%)
"Perifoliculite" ou "Mucinosse folicular"	0	2	0	0	0	0	2 (5,3%)
"Cutis laxa granulomatosa"	0	0	0	0	1	0	1 (2,6%)
"Infiltrado T epidermotrópico"	0	0	0	1	0	0	1 (2,6%)
"Dermatite liquenóide"	0	0	0	0	0	1	1 (2,6%)
"Dermatite psoriasiforme"	0	0	0	0	0	2	2 (5,3%)
"Dermatite espongiótica"	0	0	0	0	0	2	2 (5,3%)
Total	5 (13,2%)	6 (15,8%)	9 (23,7%)	6 (15,8%)	1 (2,6%)	11 (28,9%)	38 (100%)

NOTA: MF: micose fungoide; MFF: micose fungoide foliculotrópica; MFT: micose fungoide tumoral; MFE: micose fungoide eritrodérmica; CLG: cútis laxa granulomatosa; SS: síndrome de Sézary

5.3. Análise histopatológica e dos perfis imuofenotípicos

A análise dos exames anatomopatológicos e perfis imunofenotípicos das amostras de pele foram realizados subdividindo-se os pacientes em três grupos: MF e variantes, SS e dermatoses inflamatórias ou idiopáticas.

Cortes histológicos corados com hematoxilina-eosina de amostras de pele selecionadas nos três períodos foram revisados e classificados de acordo com o algoritmo proposto por Guitart et al.¹². A Tabela 3 do Anexo 2 demonstra o escore de cada uma das amostras analisadas durante o acompanhamento dos pacientes (admissão, fase intermediária e final ou desfecho).

Na maioria dos casos de SS e dermatoses inflamatórias ou idiopáticas, o acompanhamento histopatológico e imunohistoquímico se limitou ao tempo de acompanhamento intermediário. Portanto, não havia dados de exames histopatológicos de pele posteriores. Para aprimorar o estudo estatístico, o desfecho foi considerado como o último diagnóstico histopatológico do paciente, mesmo que em alguns casos tenha ocorrido durante o tempo intermediário do acompanhamento e tenha sido diferente do desfecho clínico final.

Com relação ao escore proposto por Guitart et al.¹², houve diferença estatisticamente significativa na admissão e no desfecho entre os pacientes com MF ($p= 0,012$; 95% IC [0 a 4]) e SS ($p= 0,029$; 95% IC [0 a 5]), sendo que o escore aumentou ao longo do acompanhamento em ambas. Nos pacientes com dermatoses inflamatórias ou idiopáticas, o escore manteve-se estável, não sendo evidenciada diferença entre o tempo de admissão e o desfecho ($p=0,912$; 95% IC [-2 a 5]). Quando as amostras de pele dos pacientes com MF e SS foram agrupadas e comparadas com as de dermatoses inflamatórias ou idiopáticas, houve diferença significativa entre os grupos ($p= 0,017$; 95% IC [-7,90 a -1,38]).

As Figuras 7, 8 e 9 ilustram esses resultados.

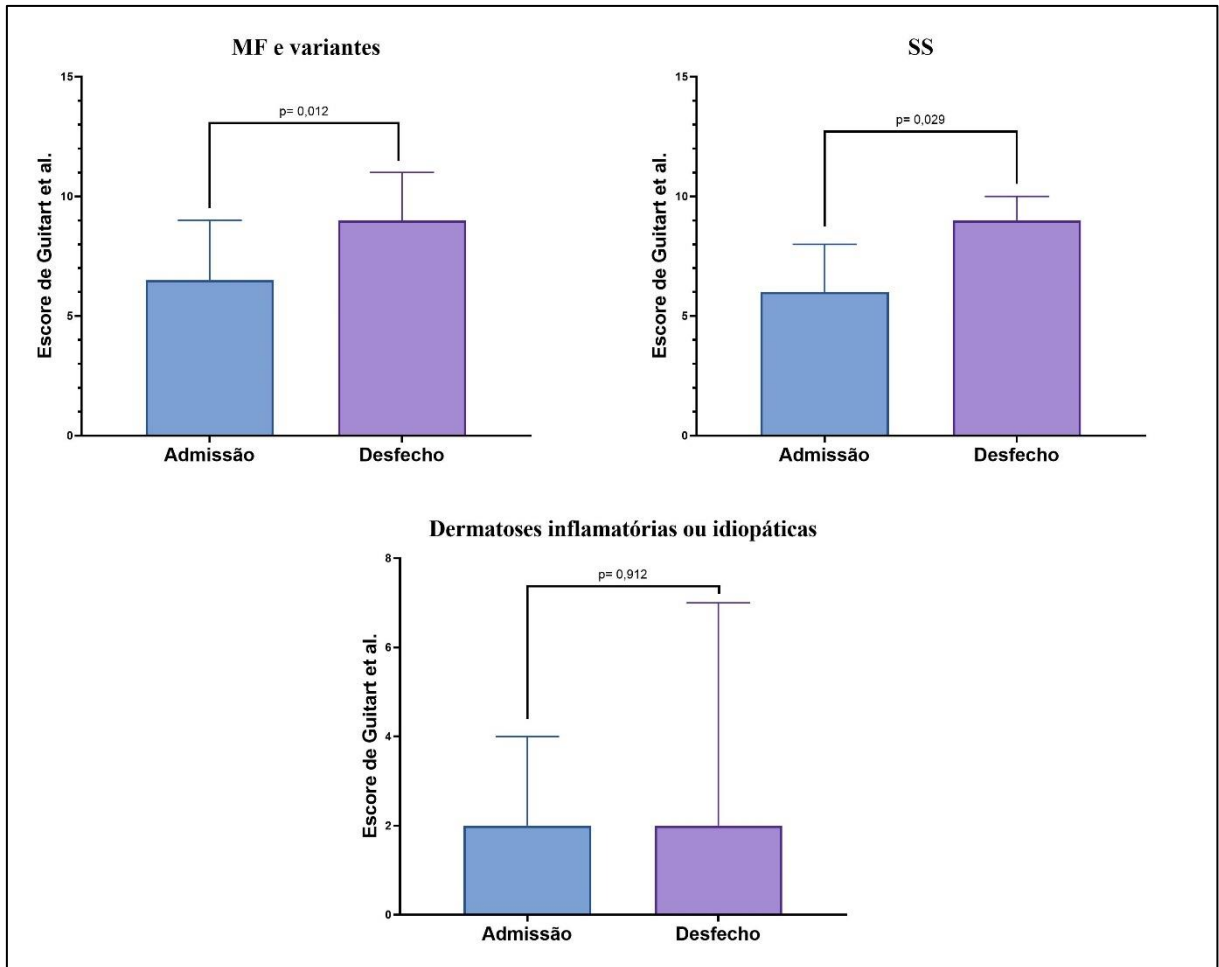


Figura 7 - Comparação das medianas do escore de Guitart et al.¹² entre os grupos de pacientes com micose fungoide, síndrome de Sézary e dermatoses inflamatórias ou idiopáticas. MF: micose fungoide; SS: síndrome de Sézary. Teste estatístico de Mann-Whitney (intervalo de confiança: 95%)

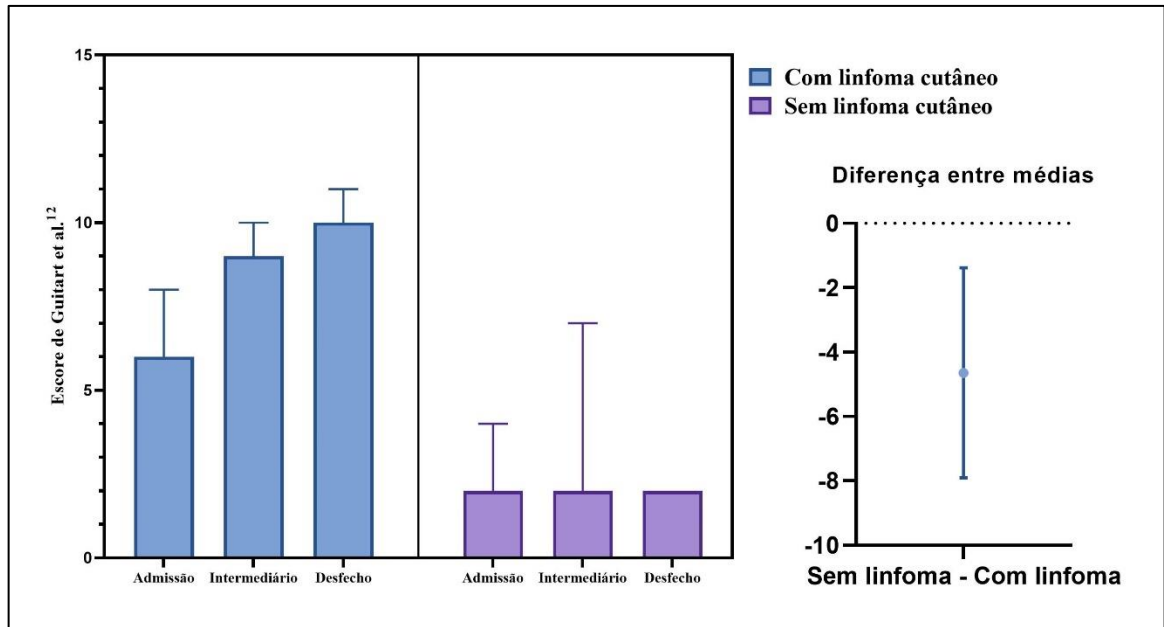


Figura 8 - Comparação das medianas do escore total de Guitart et al.¹² entre os grupos de pacientes com e sem linfoma cutâneo nos três tempos de observação clínico-patológica. Teste estatístico t de Student aninhado ($p=0,017$; intervalo de confiança: 95%)

Os grupos com e sem envolvimento linfonodal não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre si em relação ao escore de suas respectivas lesões cutâneas ($p=0,932$; 95% IC [-4,25 a 3,98]).

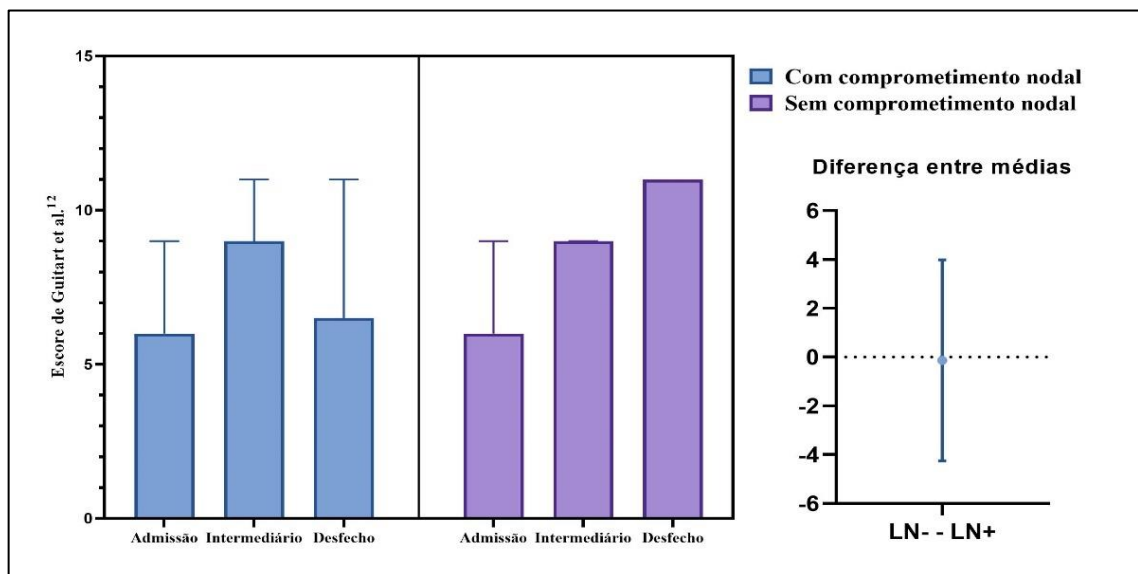


Figura 9 - Comparação das medianas do escore de Guitart et al.¹² entre os grupos com linfomas cutâneos com e sem comprometimento linfonodal, nos três tempos de observação clínico-patológica. Nota: teste estatístico t de Student aninhado ($p=0,932$; intervalo de confiança: 95%)

A análise semiquantitativa do perfil imunofenotípico das amostras de pele dos grupos de dermatose inflamatória ou idiopática e dos casos de MF e SS está demonstrada na Tabela 4 do Anexo 2.

As amostras com diagnósticos de MF clássica, MF foliculotrófica, MF tumoral e MF eritrodérmica foram agrupadas para melhor análise imunofenotípica. Esse agrupamento revelou expressão forte e difusa de marcadores T, como CD3 (mediana de escore 5+; 95% IC [5 a 5]) e CD4 (mediana de escore 5+; 95% IC [4 a 5]), que se manteve ao longo do acompanhamento. O CD7 (mediana de escore 2+; 95% IC [1 a 3]) já se encontrava reduzido na admissão e se manteve estável. Notou-se discreto aumento do antígeno Ki-67 ao longo da evolução, tendo mediana de escore 2+ (95% IC [1 a 3]) na admissão e escore 3+ (95% IC [1 a 4]). A Figura 10 demonstra os perfis imunofenotípicos ao longo da admissão, tempo intermediário e desfecho.

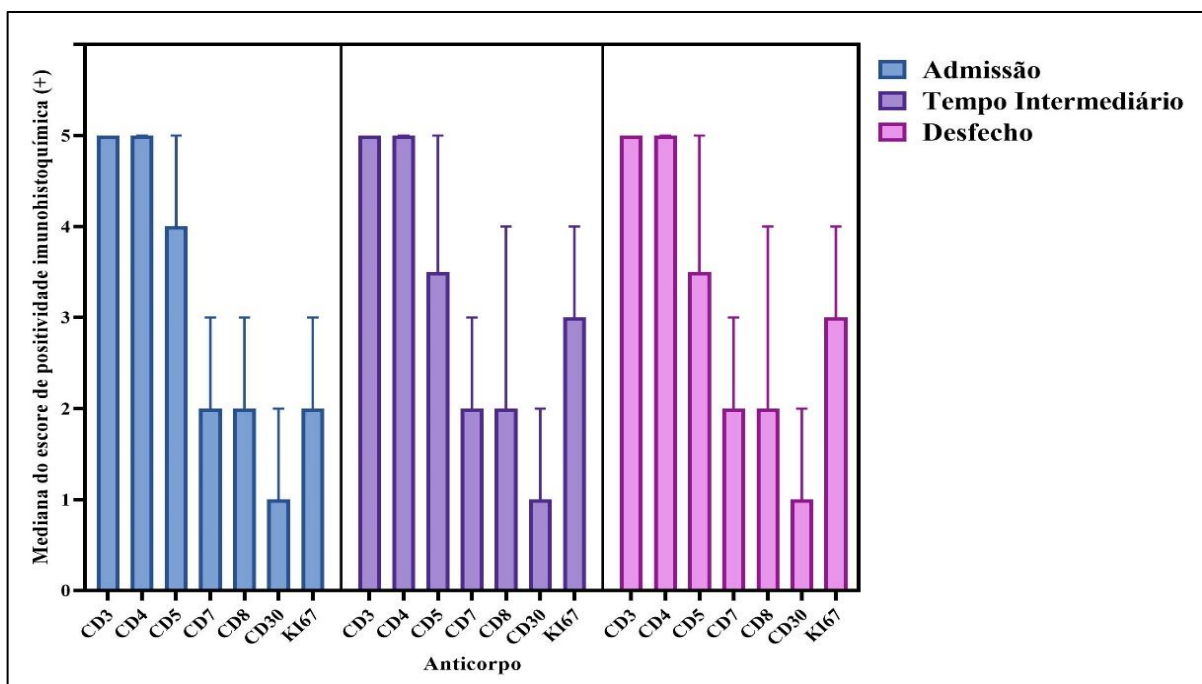


Figura 10 - Perfil imunofenotípico das amostras de pele de pacientes com micose fungoide (MF) ao longo do acompanhamento. Intervalo de confiança – 95%

As amostras de pele dos pacientes com SS apresentaram expressão forte e difusa de marcadores T, como CD3 e CD4 (mediana de escore 5+; 95% IC [4 a 5]), que se mantiveram ao longo do acompanhamento. O CD7 (mediana de escore 2+; 95% IC [1 a 4]) também se manteve estável, como pode ser observado na Figura 11.

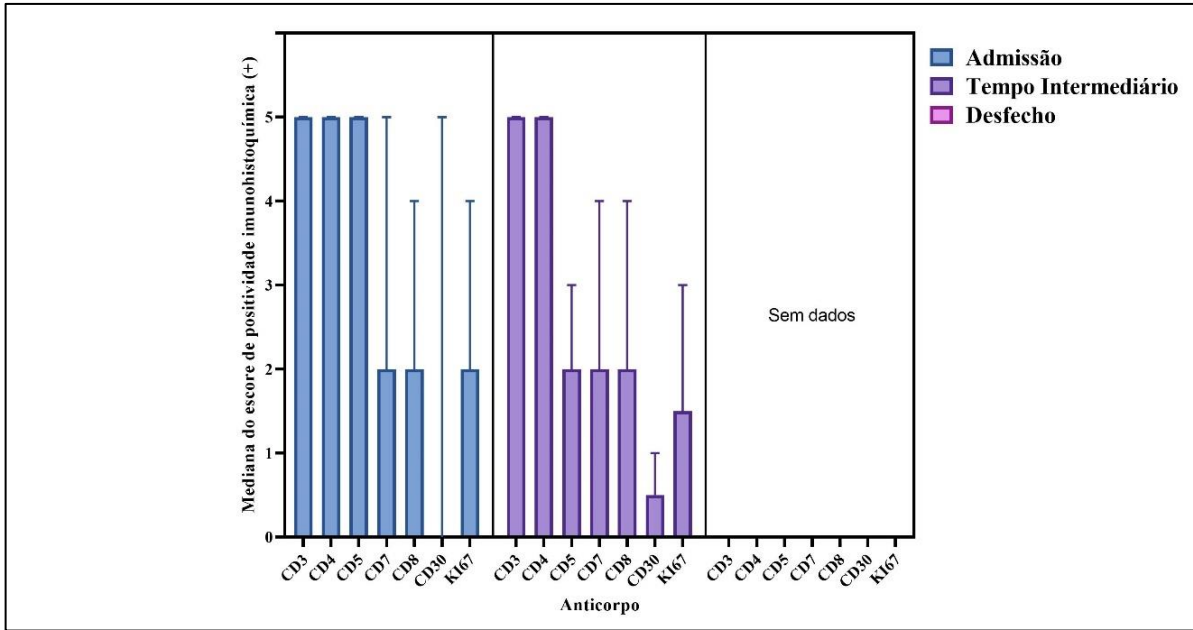


Figura 11 - Perfil imunofenotípico das amostras de pele de pacientes com síndrome de Sézary à admissão e no tempo intermediário. SS: síndrome de Sézary. Tempo intermediário considerado como desfecho. Intervalo de confiança de 95%

A Figura 12 demonstra que as lesões dos pacientes do grupo sem linfoma não apresentaram perda de marcadores T, com CD3 (mediana de escore 5+; 95% IC [5 a 5]) e CD4 (mediana de escore 5+; 95% IC [4 a 5]) e CD7 (mediana de escore 4+; 95% IC [3 a 5]) mantendo-se estáveis ao longo do acompanhamento.

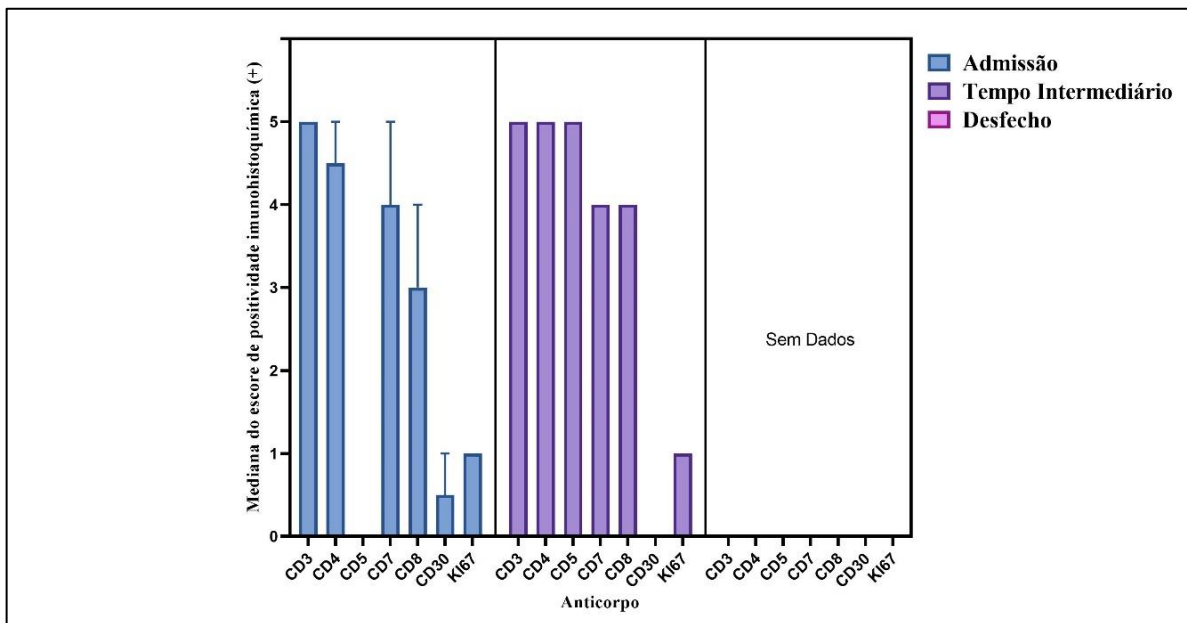
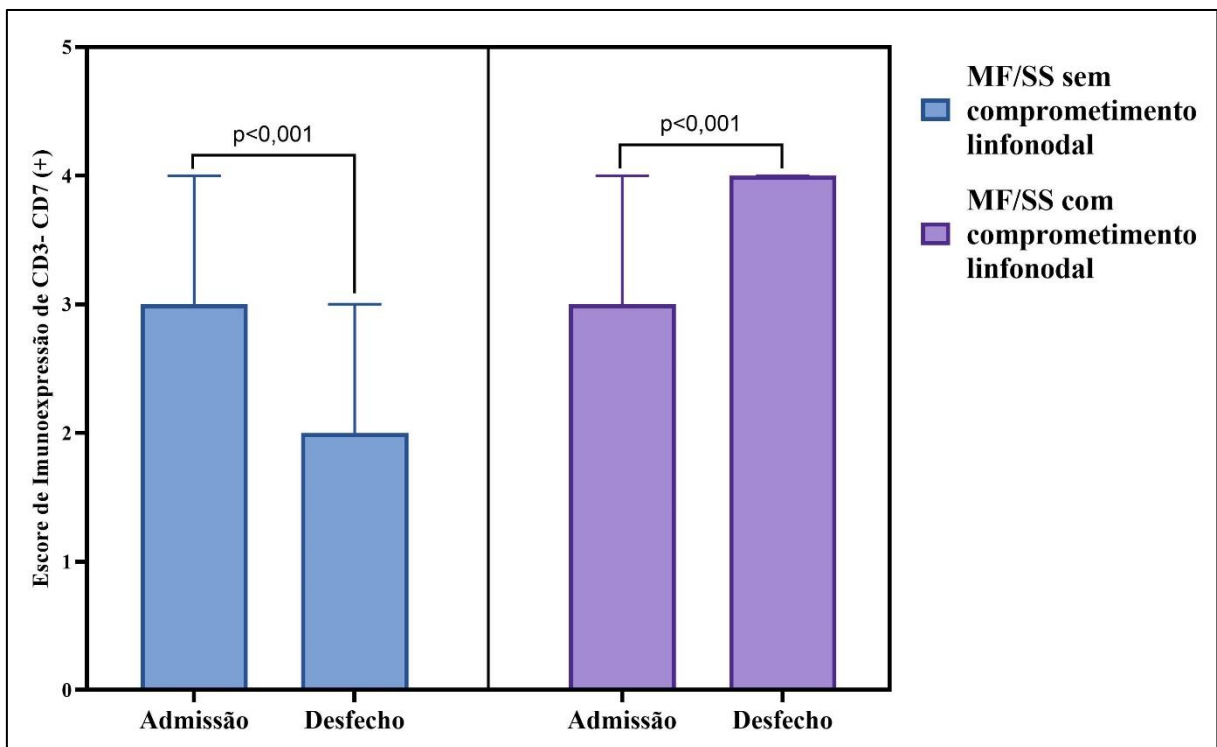


Figura 12 - Perfil imunofenotípico das amostras de pele de pacientes com dermatoses inflamatórias ou idiopáticas à admissão e no tempo intermediário. Tempo intermediário considerado como desfecho. Intervalo de confiança de 95%

Para o estudo da perda de CD7 entre os grupos com e sem comprometimento linfonodal, foi subtraído o valor do escore de expressão de CD7 do de CD3.

No grupo sem comprometimento linfonodal, a perda de CD7 foi menor ao longo do acompanhamento, com variação da diferença de mediana de 1+ para menos ($p < 0,0001$; 95% IC [1,00 a 3,00]). No grupo com comprometimento linfonodal, a perda foi mais expressiva, com variação da diferença de mediana aumentando 1+ ($p < 0,001$; 95% IC [2,00 a 4,00]). No entanto, ao comparar os dois grupos, não se observou significância estatística ($p = 0,182$; 95% IC [-1,13 a 3,12]), como demonstrado no Gráfico 4.

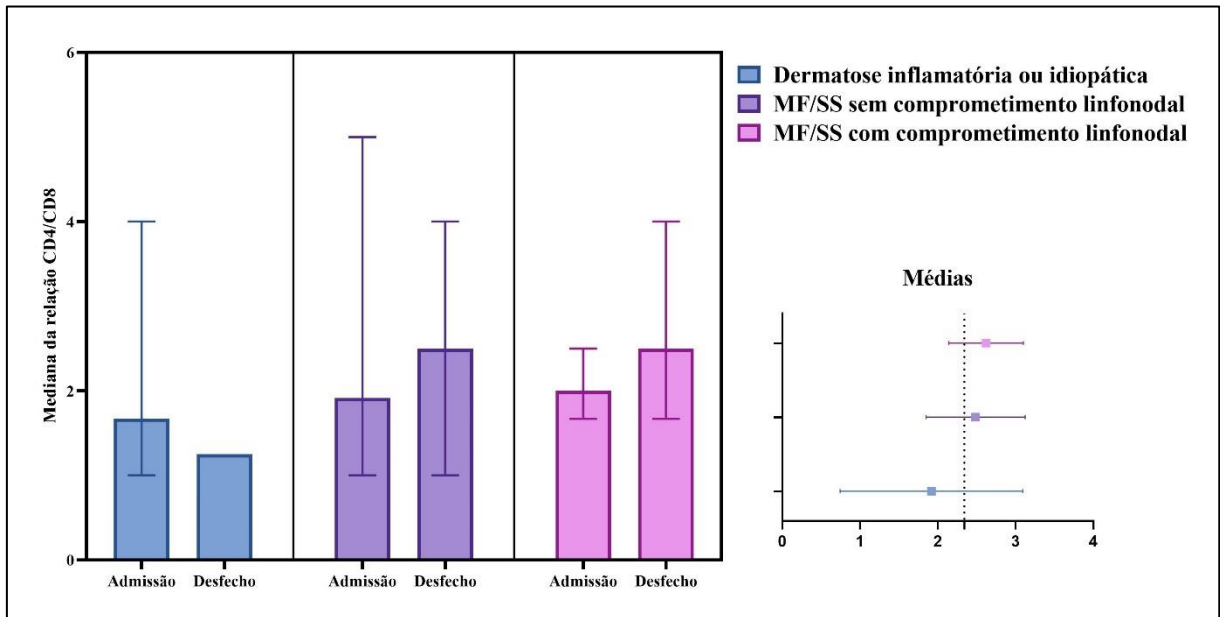
Gráfico 4 - Evolução da perda de CD7 em relação ao CD3 dos grupos de linfoma com e sem acometimento nodal



NOTA: MF: micose fungoide, SS: síndrome de Sézary. Teste de Wilcoxon. Intervalo de confiança de 95%

Para o estudo da relação CD4/CD8, foi dividido o escore de imunoposição de CD4 pelo de CD8, sendo maior entre os pacientes com linfoma, porém sem diferença estatisticamente significativa ($p = 0,541$) entre os grupos de dermatoses inflamatórias e idiopáticas e de linfoma com e sem comprometimento linfonodal, como pode ser observado no Gráfico 5.

Gráfico 5 - Evolução da relação CD4/CD8 entre os grupos de estudo (sem linfoma e com linfoma) à admissão e ao desfecho



NOTA: MF: micose fungoide. SS: síndrome de Sézary. Intervalo de confiança – 95%. Teste de variância ANOVA

5.4. Análise dos macrófagos M2

A análise morfológica dos espécimes de pele demonstrou que os macrófagos M2 encontravam-se predominantemente em região perivascular, associados ao processo inflamatório. Frequentemente, foram observados macrófagos com coexpressão de CD163 e c-MAF (macrófagos M2) em íntimo contato e, por vezes, atravessando a parede vascular. Em menor número, distribuía-se no interstício, entre as fibras colágenas e regiões de fibroplasia. As Figuras 13, 14, 15, 16 e 17 ilustram a distribuição de macrófagos M2 (que coexpressam CD163 e c-MAF) no microambiente dérmico de lesões inflamatórias e de doentes com linfoma da casuística estudada.

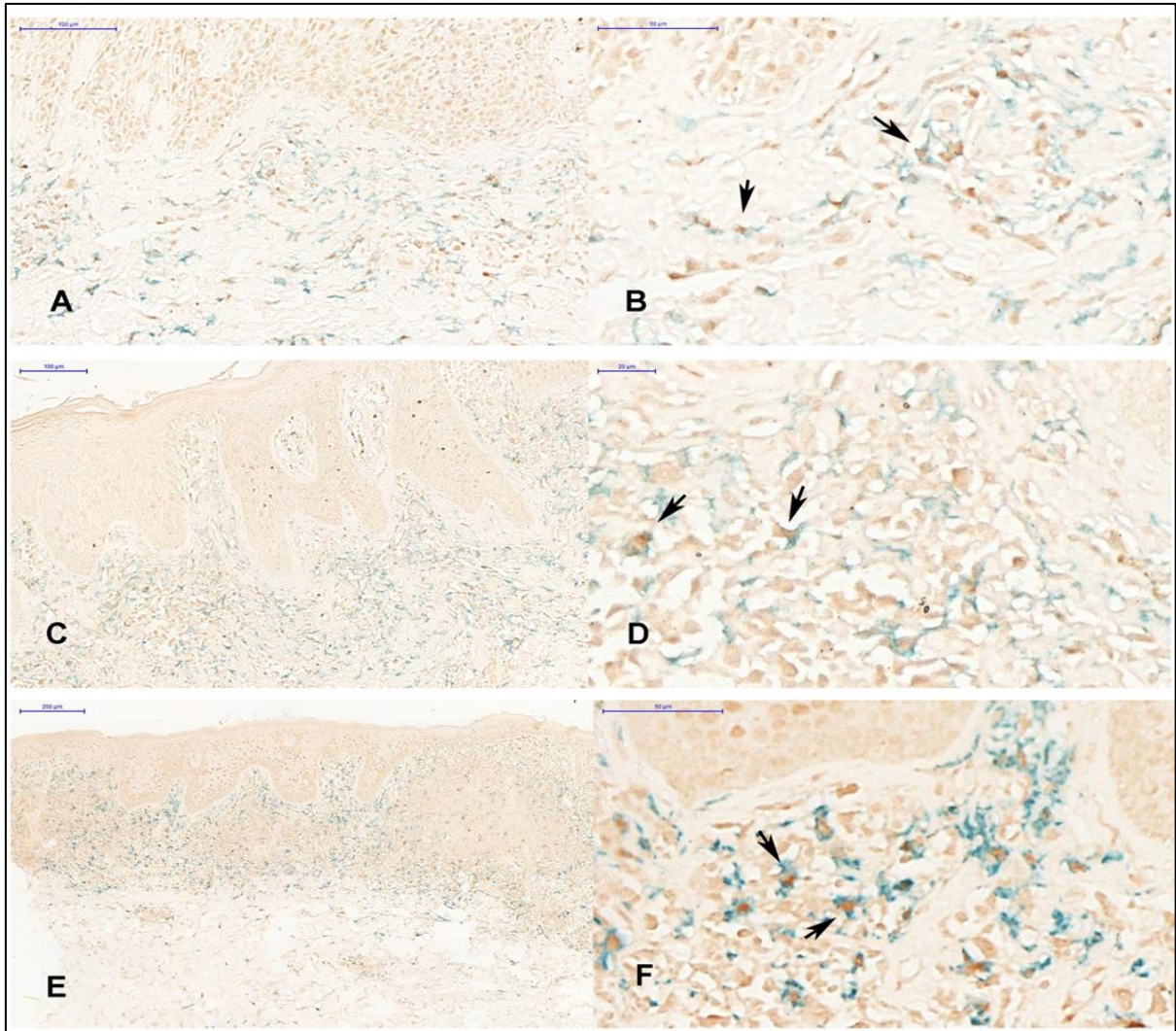


Figura 13 - Estudo microscópico dos macrófagos M2 nos casos 4, 5 e 6. A e B. Caso número 4 com diagnóstico à admissão de infiltrado linfoide atípico e história de evolução para linfoma T periférico sem comprometimento linfonodal ao longo do acompanhamento. C e D. Caso número 6 com perda intensa da expressão de CD7 à admissão e diagnóstico posterior de MF sem comprometimento linfonodal ao longo do acompanhamento. E e F. Caso número 5 com diagnóstico de MF à admissão com posterior evolução para transformação em grandes células, não sendo conhecido o “status” linfonodal. As setas marcam as células positivas para dupla marcação com CD163/c-MAF

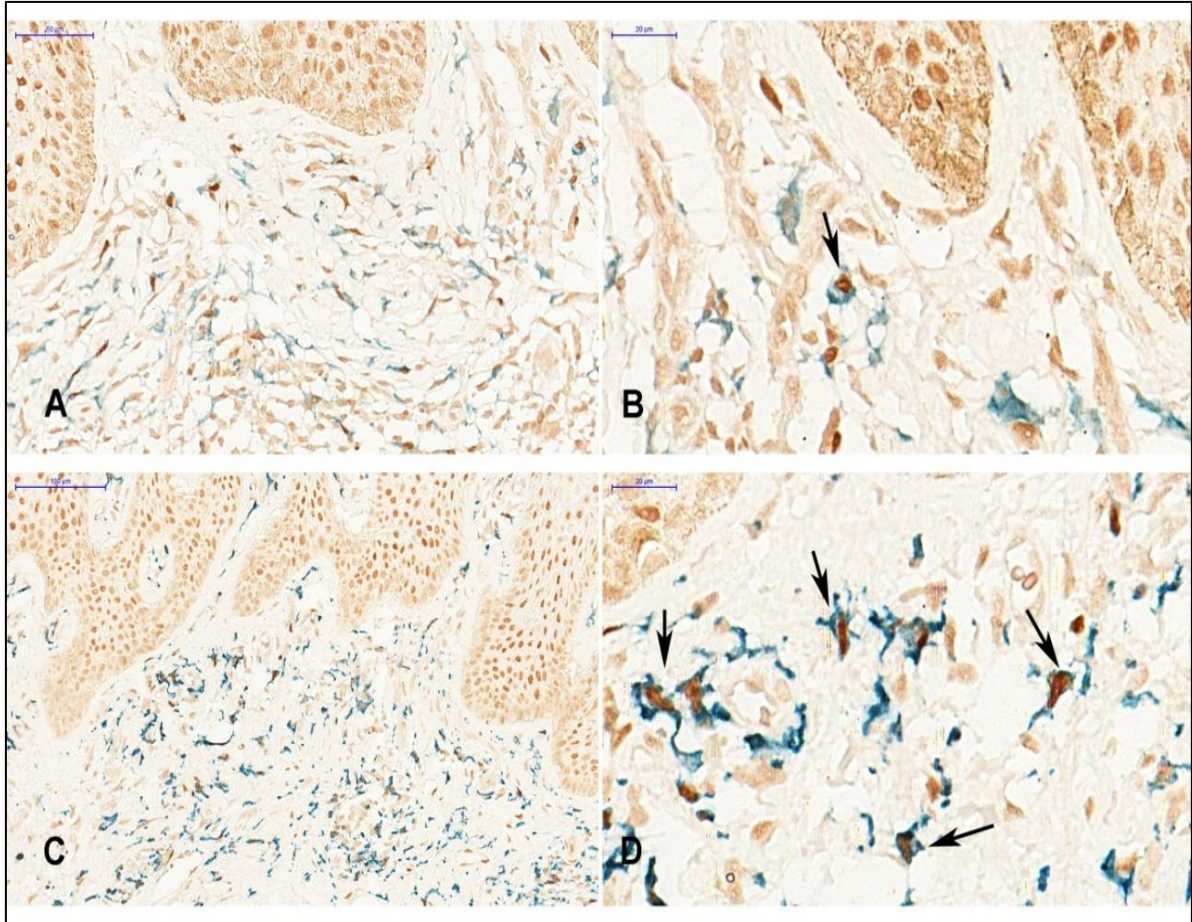


Figura 14 - Estudo microscópico dos macrófagos M2 nos casos 16 e 17. A e B. Caso número 16 com diagnóstico de dermatite psoriasiforme, consistente com psoríase com biópsia linfonodal negativa para malignidade. C e D. Caso número 17 com diagnóstico de dermatite psoriasiforme e espongíotica (possibilidade de dermatite eczematosa) com biópsia linfonodal negativa para malignidade. As setas marcam as células positivas para dupla marcação com CD163/c-MAF

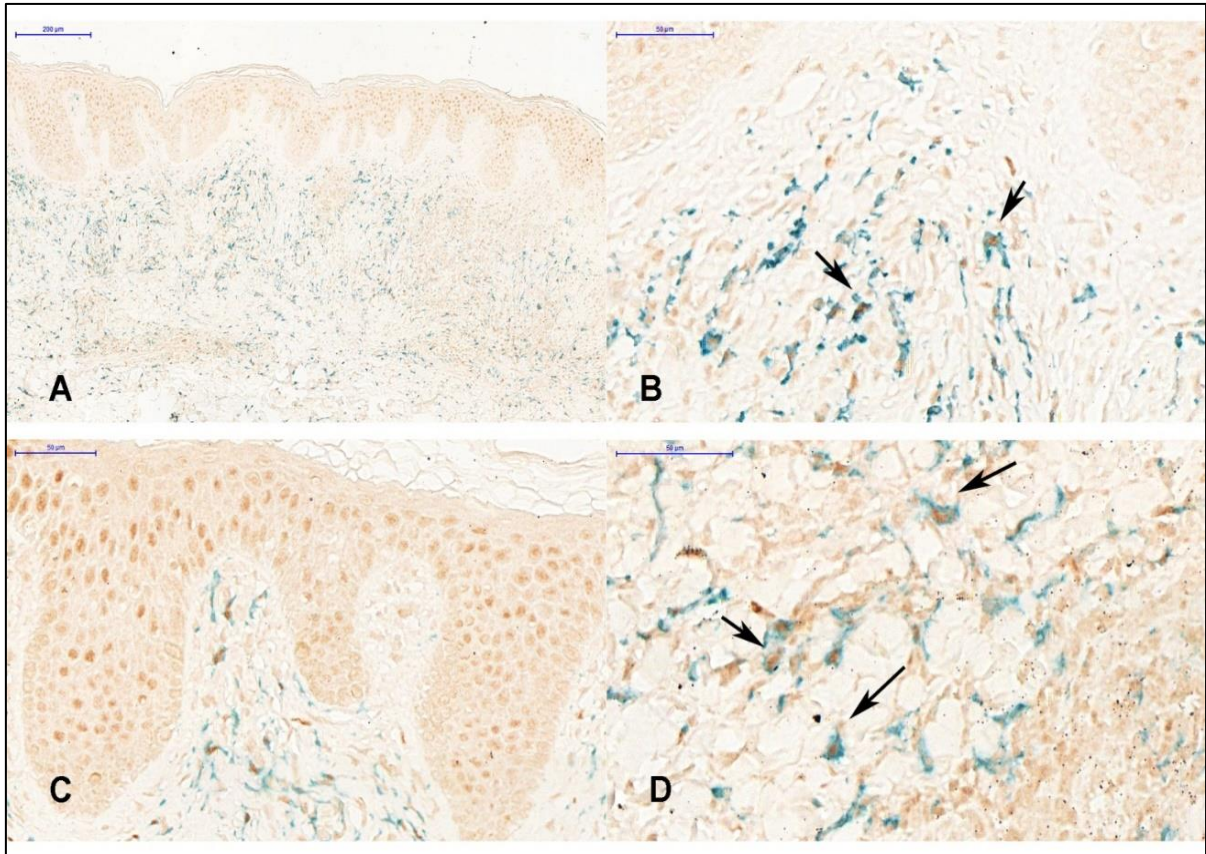


Figura 15 - Estudo microscópico dos macrófagos M2 nos casos 10 e 12. A e B. Caso número 10 com diagnóstico à admissão de micose fungoide sem comprometimento linfonodal ao longo do acompanhamento. C e D. Caso número 12 com diagnóstico à admissão de micose fungoide com posterior evolução para transformação em grandes células sem comprometimento linfonodal ao longo do acompanhamento. As setas marcam as células positivas para dupla marcação com CD163/c-MAF

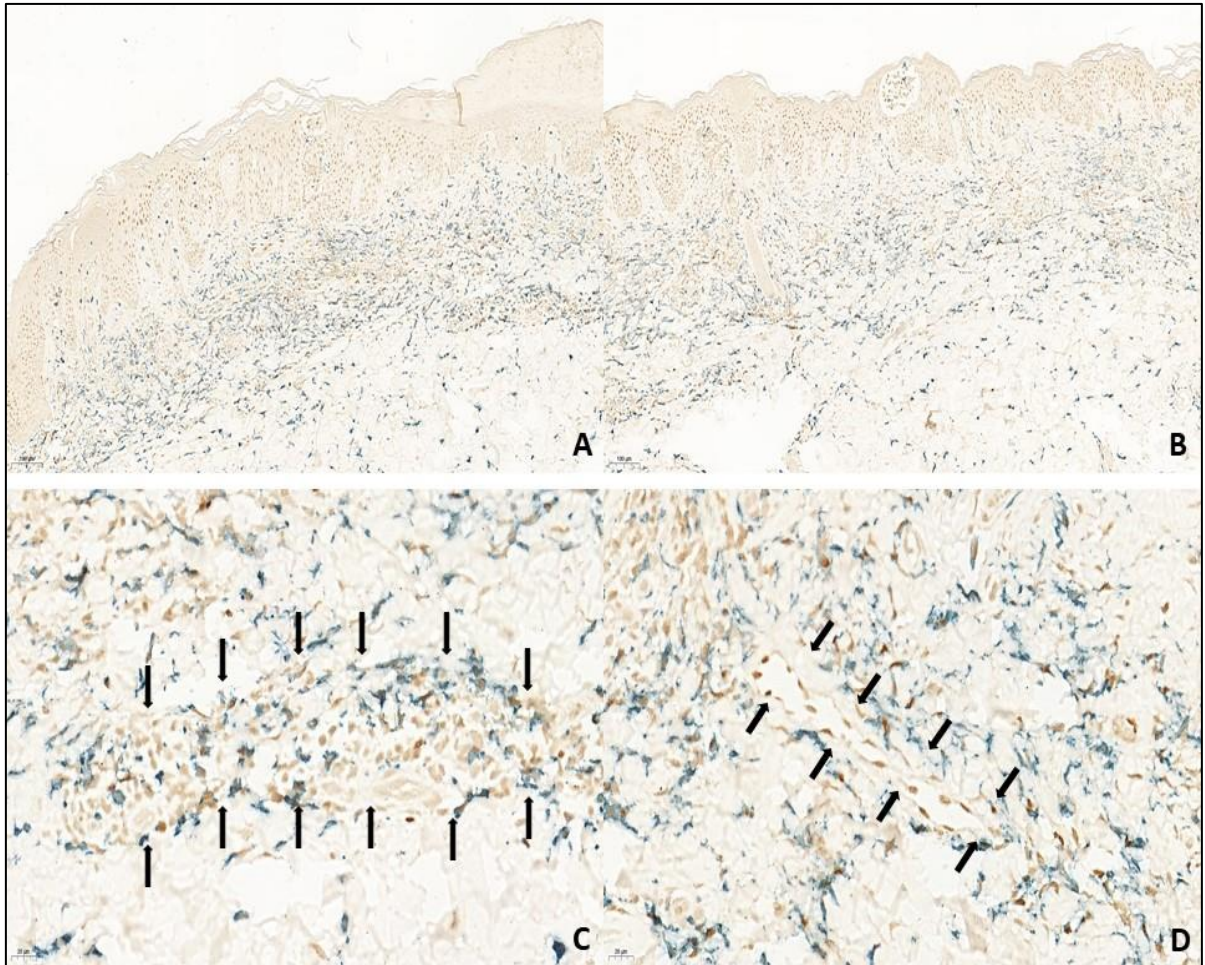


Figura 16 - Estudo microscópico dos macrófagos M2 no caso 48. A e B. Caso número 48 com diagnóstico à admissão de micose fungoide com comprometimento linfonodal (estádio N3). Há intenso epidermotropismo com microabscesso de Pautrier, além de aumento de macrófagos M2 no interstício. C e D. Imagem ampliada do mesmo caso demonstrando infiltrado inflamatório de macrófagos M2 perivascular (dupla imunomarcção de CD163/c-MAF). Setas delimitando a parede vascular

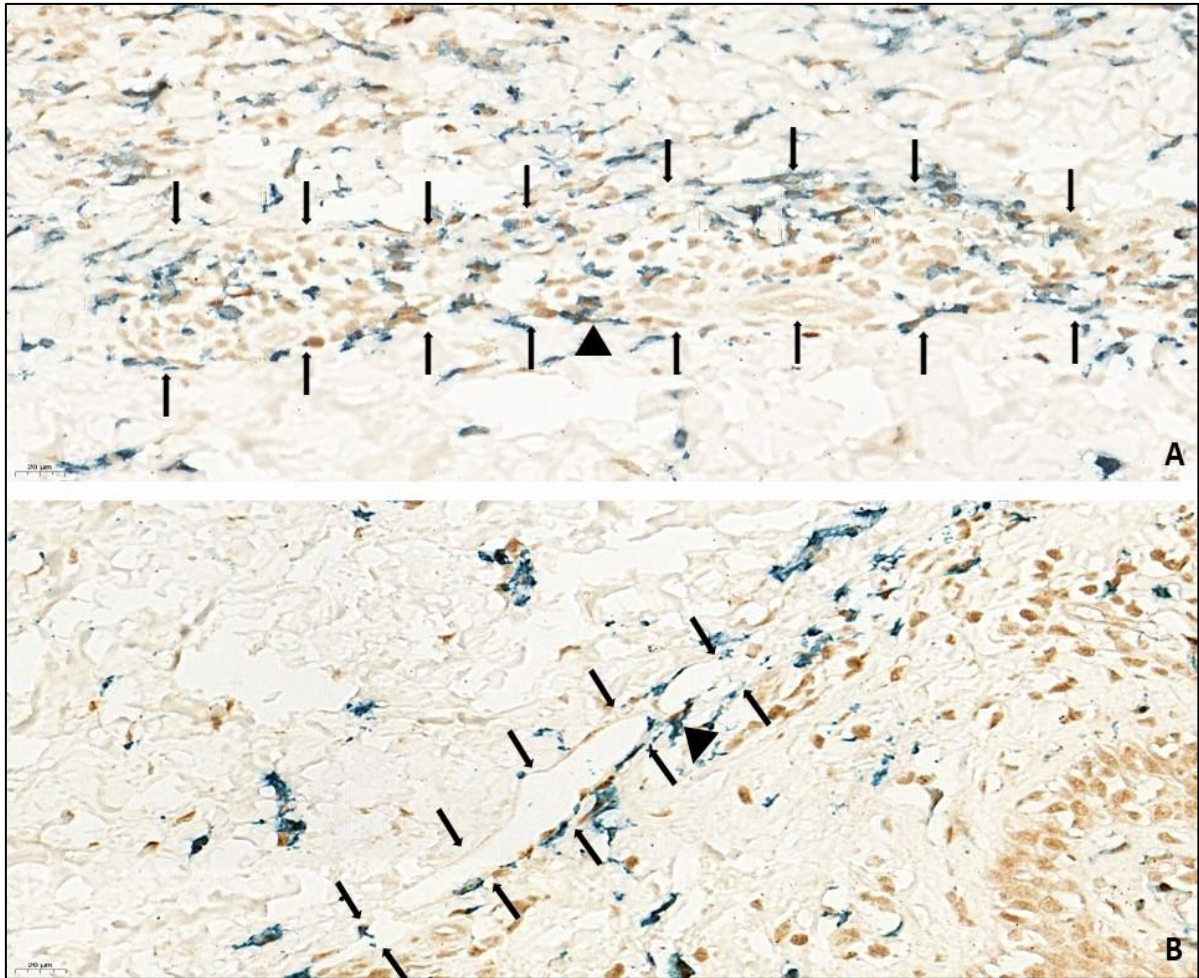


Figura 17 - Estudo microscópico da distribuição dos macrófagos M2 nos casos 48 e 32. A. Caso número 48 com diagnóstico à admissão de micose fungoide clássica com comprometimento linfonodal (estádio N3). B. Caso número 32 com diagnóstico de micose fungoide clássica à admissão, sem comprometimento linfonodal ao longo do acompanhamento. Notar em ambas as imagens estruturas vasculares na derme superficial apresentando macrófagos com dupla imunomarcção (M2) em íntimo contato com a parede vascular externa. Há também focos de segmentos citoplasmáticos imunomarcados em azul (cabeça de seta) no interior do vaso, mostrando possivelmente aderência e transmigração endotelial do macrófago

A análise das médias de macrófagos M2/mm² por grupos revelou aumento progressivo do número médio dessas células ao longo do acompanhamento, porém sem significância estatística ($p=0,461$) pelo teste de variância ANOVA, como demonstrado na Tabela 8 e Figura 18.

Tabela 8 - Tabela comparativa das médias de macrófagos M2 por grupos

	Dermatoses inflamatórias ou idiopáticas	MF/SS sem comprometimento nodal	MF/SS com comprometimento nodal
n	10	15	23
Mínimo	245,0	130,0	208,0
Máximo	604,0	641,0	831,0
Variação	359,0	511,0	623,0
Média ± desvio padrão	395,0 ± 104,3	360,5 ± 141,7	448,8 ± 170,1

NOTA: MF: micose fungoide; SS: síndrome de Sézary

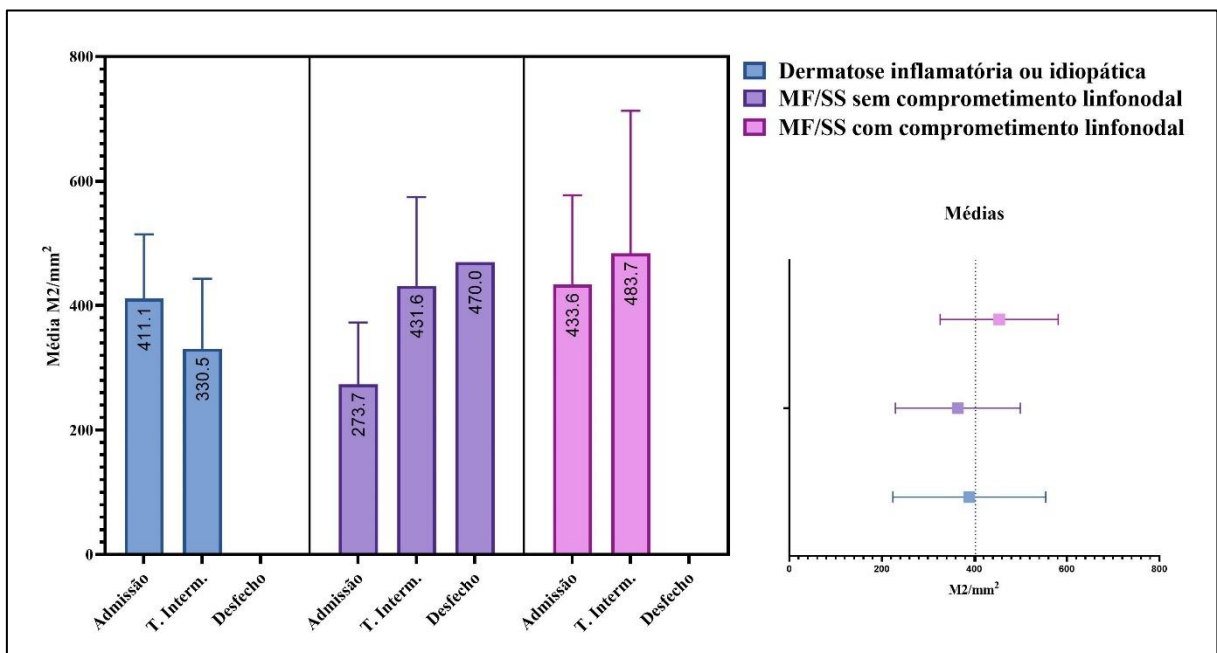


Figura 18 - Média do número de macrófagos M2 nas amostras de pele dos grupos de estudo ao longo do período de análise. Ao lado direito, o gráfico de linhas horizontais mostra a diferença entre as médias em cada grupo ($p=0,461$). M2: macrófagos M2; MF: micose fungoide; SS: síndrome de Sézary; T. interm.: tempo intermediário. Teste de variância ANOVA

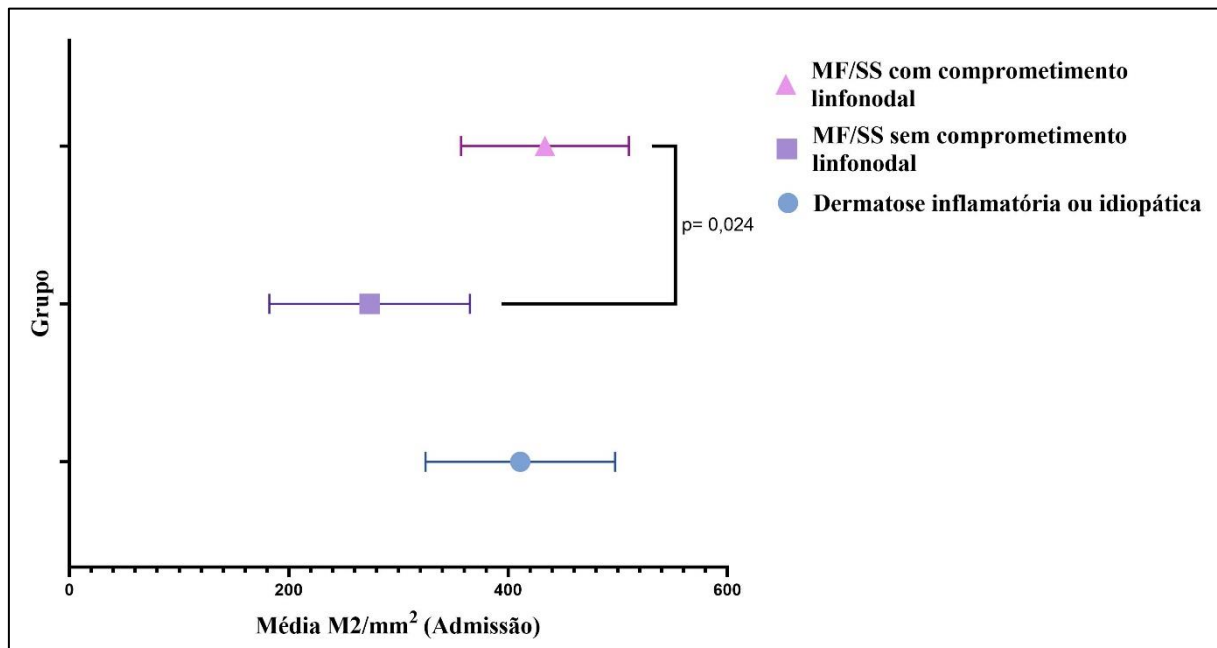
No intuito de eliminar da análise qualquer influência de tratamento ou viés que possa ter ocorrido ao longo do acompanhamento, foram comparadas somente as médias de macrófagos M2 das amostras da admissão de pacientes que evoluíram ou não com acometimento linfonodal. Os dados obtidos estão na Tabela 9 e Gráfico 6.

Tabela 9 - Comparação das médias do número de macrófagos M2/mm², à admissão, nas amostras de pele das lesões dos pacientes dos grupos de estudo que evoluíram com e sem envolvimento linfonodal

	Dermatoses inflamatórias ou idiopáticas	MF/SS sem comprometimento nodal	MF/SS com comprometimento nodal
Número de casos	8	7	16
Mínimo	245,0	130,0	208,0
Máximo	604,0	389,0	702,0
Variação	359,0	259,0	494,0
Média ± desvio padrão	411,1 ± 103,4	273,7 ± 98,92	433,6 ± 143,7

NOTA: MF: micose fungoide; SS: síndrome de Sézary

Gráfico 6 - Diferença entre as médias de macrófagos M2/mm² nas lesões cutâneas iniciais de cada grupo de estudo, de acordo com o comprometimento linfonodal



NOTA: MF: micose fungoide; SS: síndrome de Sézary. Teste de variância ANOVA com comparação múltipla pelo teste de Tukey

Observou-se que houve diferença significativa entre todos os grupos ($p= 0,028$) no teste de variância ANOVA, e especialmente entre os grupos de doentes com e sem comprometimento linfonodal ($p= 0,024$; 95% IC [-301 a -18,8]) no teste de comparação múltipla de Tukey.

Foi elaborada uma curva de características operacionais (ROC), demonstrada na Figura 19, para verificar a sensibilidade e especificidade do número de macrófagos M2/mm² das amostras de biópsias de pele à admissão para predizer possível envolvimento nodal ($p= 0,019$;

95% IC [0,627 a 0,998]). Além disso, foi calculado o índice de Youden ($J= 0,527$) para definir um ponto de corte ideal, que foi de ≥ 333 macrófagos/mm². A Tabela 10 demonstra os dados da análise.

Tabela 10 - Dados da curva de características operacionais (ROC) de macrófagos M2/mm² em amostras de biópsias à admissão de pacientes com linfoma que evoluíram com e sem envolvimento linfonodal

Pacientes	n
Acometidos ⁽¹⁾	7
Controles ⁽²⁾	16
Total	23
Área abaixo da curva ROC	0,813
Erro padrão	0,095
Intervalo de confiança (95%)	0,627 a 0,998
Valor-p	0,019

NOTA: ⁽¹⁾ pacientes com MF/SS e envolvimento linfonodal. ⁽²⁾ pacientes com MF/SS sem envolvimento linfonodal; MF: micose fungoide; SS: síndrome de Sézary

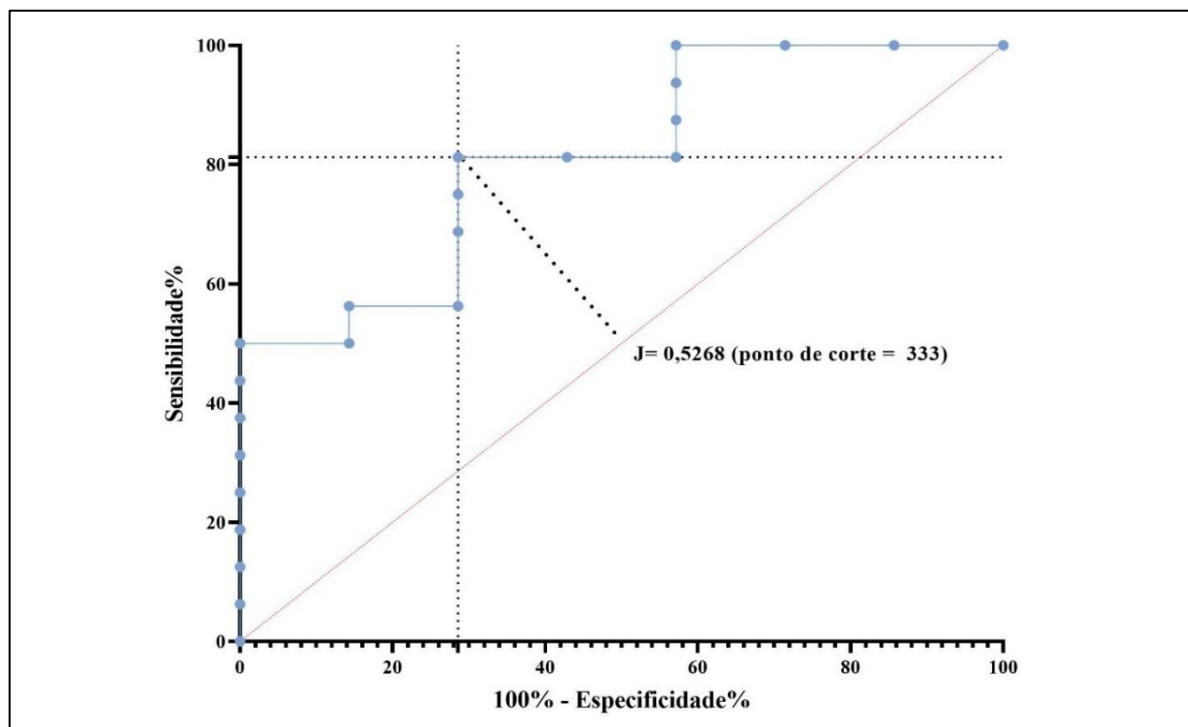


Figura 19 - Curva de características operacionais (ROC) do número de macrófagos M2 na admissão e comprometimento linfonodal. Determinação da especificidade, sensibilidade e número de corte do número de macrófagos M2/mm² nas amostras de pele, obtidas na admissão de doentes com diagnóstico de linfoma, como índice preditivo de envolvimento linfonodal ($p= 0,019$). Curva ROC com índice de Youden (J)

A mesma análise, excluindo as amostras de pele dos pacientes com estadiamento N1b, apresentou resultados semelhantes. Na curva ROC, a conclusão foi a mesma ($p= 0,024$ e área sob a curva= 0,813).

Considerando o ponto de corte obtido de ≥ 333 macrófagos/mm², foi elaborada a tabela de contingência (ver Tabela 11) relacionando o envolvimento nodal com o número de macrófagos M2/mm² (“Odds ratio”=10,8; 95% IC [1,58 a 65,9]).

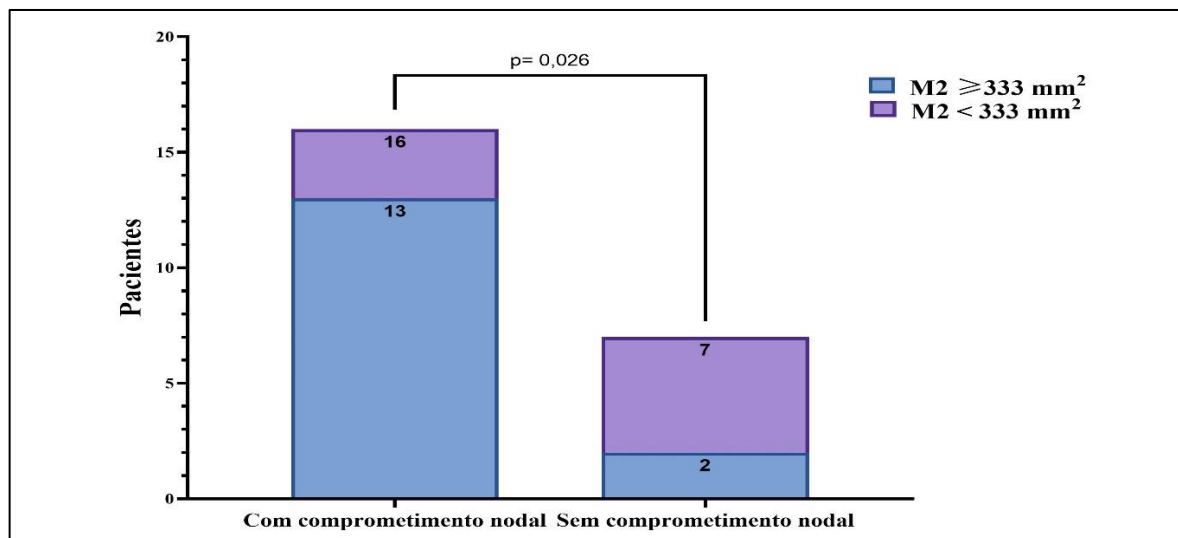
Tabela 11 - Comparação do número de macrófagos M2/mm² nas amostras de pele de biópsias à admissão com o envolvimento linfonodal ao desfecho

Pacientes	M2/mm ² ≥ 333 Admissão	M2/mm ² < 333 Admissão	Total
LN+	13	3	16
LN-	2	5	7
Total	15	8	23
“Odds ratio”		10,8	
Intervalo de confiança (95%)		1,58 a 65,9	
Valor-p		0,026	

NOTA: LN- e LN+: envolvimento linfonodal negativo e positivo; M2: macrófagos M2. Teste exato de Fisher

O Gráfico 7 demonstra a comparação dos pacientes do grupo de linfoma que evoluíram sem e com comprometimento linfonodal de acordo com o ponto de corte de ≥ 333 macrófagos M2/mm² nas amostras de pele à admissão.

Gráfico 7 - Comparação do número de pacientes do grupo de linfoma com ou sem acometimento linfonodal ao desfecho em relação ao ponto de corte de ≥ 333 macrófagos M2/mm² nas amostras de biópsia à admissão



NOTA: M2: macrófago M2. Teste exato de Fisher

Não foram observadas diferenças no número de macrófagos M2/mm² das amostras das lesões de pele de pacientes com linfoma cutâneo ao longo do acompanhamento e do desfecho de morte ($p= 0,984$; 95% IC [-101,9 a 99,87]), conforme pode ser observado na Figura 20. Todos esses dados encontram-se disponíveis na Tabela 5 do Anexo 2.

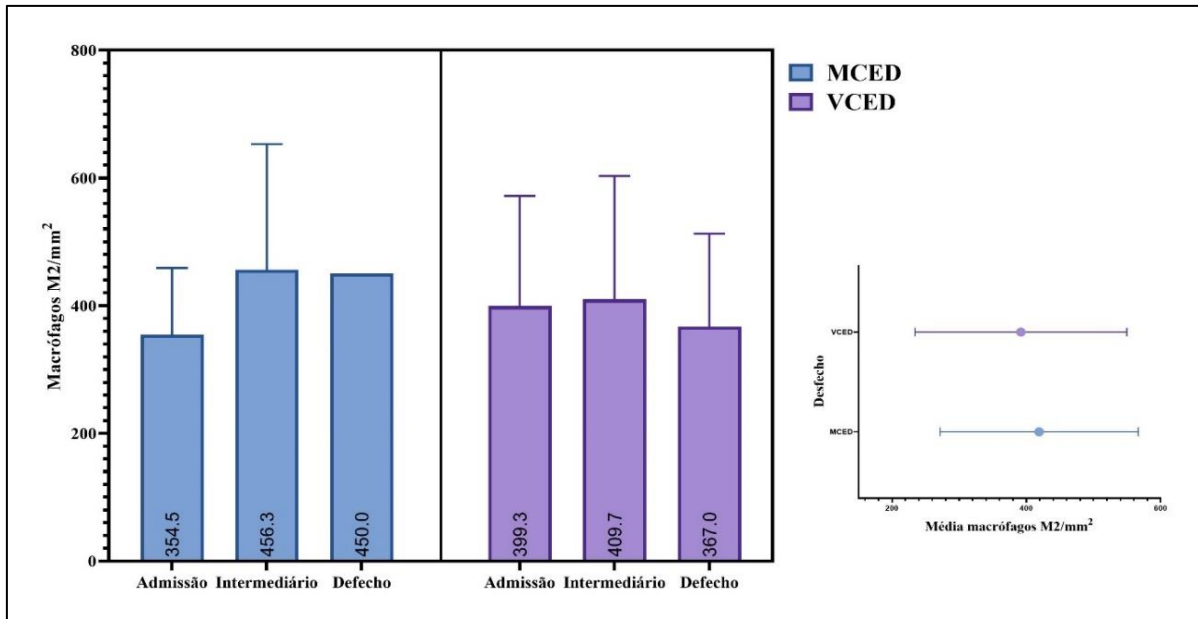
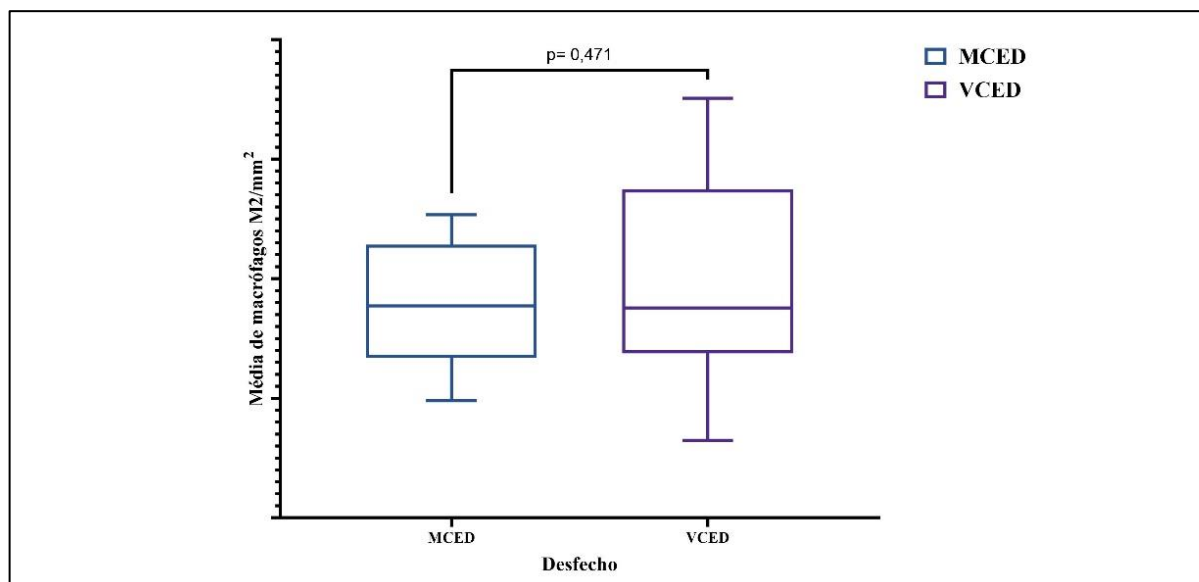


Figura 20 - Comparação da densidade de macrófagos M2 (células/mm²) nas amostras de biópsias do grupo de linfoma desde a sua admissão até o desfecho se vivo com doença ou morto pela doença. MCED: morto com evidência de doença; VCED: vivo com evidência de doença. Teste de t de Student aninhado

Ao se realizar a mesma análise considerando apenas as amostras de biópsias obtidas na admissão, também não foi observada diferença significativa ($p = 0,471$; 95% IC [-81,6 a 171]) no desfecho, como pode ser visto no Gráfico 8.

Gráfico 8- Comparação da média de macrófagos M2 (células/mm²) nas amostras de biópsias à admissão do grupo de linfoma até o desfecho se vivo com doença ou morto pela doença



NOTA: MCED: morto com evidência de doença; VCED: vivo com evidência de doença. Teste t de Student

6. DISCUSSÃO

A MF e a SS são os tipos mais comuns de linfoma cutâneo de células T da pele, correspondendo a cerca de 60% dos linfomas cutâneos de células T^{1,20}. Estudos epidemiológicos são limitados acerca de estatísticas sobre estes linfomas, sobretudo devido a restrições populacionais e geográficas. Neste estudo, a prevalência destes linfomas foi maior em homens (1,1H:1M), ligeiramente abaixo dos resultados de outros autores, que variam de 1,5 a 2,1H:1M^{1,23,38}.

Foram analisados prontuários e 187 amostras de lesões de pele e linfonodo de 55 pacientes. A mediana global de idade de início da doença foi de 54 anos, sendo 53 na MF e 54 na SS. Na MF, a mediana relatada na literatura varia comumente entre 50 e 60 anos de idade, com mínima de 45 anos segundo Willemze et al.¹⁹ e alcançando até 63 anos em estudo realizado por Scarisbrisk et al.³⁸.

Em relação à etiologia, estudos corroboram para origem de natureza multifatorial da MF e da SS. Eles apontam para a influência de fatores genéticos^{4,5,6}, ambientais^{33,34}, virais⁷ e bacterianos⁸, bem como estados inflamatórios crônicos na patogênese desses linfomas cutâneos⁹. Esses fatos não foram levados em consideração neste estudo, sendo selecionada população aleatória dentro do universo de casos com biópsias de pele e linfonodo disponíveis na instituição.

O curso clínico da MF é geralmente indolente com apresentação variada e pode ser dividido em três estágios principais: fase de “patches”, placas e tumores. A SS, por outro lado, é uma forma mais agressiva de linfoma cutâneo de células T e apresenta curso clínico mais rápido, com eritrodermia, linfadenopatia e envolvimento sanguíneo (células de Sézary). Por isso, em fases iniciais, onde há somente lesões inespecíficas e indolentes, o diagnóstico é complexo e depende estritamente das correlações clínicas e evolutivas, além de exames histopatológico, imunohistoquímico e molecular^{11,12,13,19,21}.

Neste estudo, foi observado que a maioria dos diagnósticos de SS foram inicialmente realizados como condições inflamatórias (psoríase, eczema, farmacodermia). Já na MF, os diagnósticos iniciais foram mais acurados sendo a variante foliculotrópica a que teve maior concordância diagnóstica com o desfecho.

O estadiamento pelo sistema da ISCL/EORTC^{20,60} foi realizado nas várias etapas do acompanhamento clínico. Observou-se evolução lenta e gradual dos parâmetros TNMB, com

mediana na admissão de T2b N1 M0 B0a (estádio IIA), consistente com demais estudos epidemiológicos (estádios I e II)^{1,2,19,20,63,64}. Ao final do acompanhamento o estágio mediano foi T3 N1b M0 B0b (estádio IIB).

Devido ao curso indolente da MF e à natureza mais agressiva da SS, a sobrevida dos pacientes pode variar. Geralmente, pacientes com MF têm uma sobrevida mais longa em comparação aos pacientes com SS, que apresentam prognóstico mais desfavorável devido à rápida progressão da doença e à maior probabilidade de envolvimento extracutâneo^{1,2,38,64}.

As taxas de sobrevida em cinco anos observadas neste estudo foram de 88,8% para pacientes sem envolvimento nodal e 70,1% para aqueles com envolvimento nodal. Estudos que avaliaram cerca de 1500 pacientes com linfoma cutâneo de células T encontraram uma sobrevida em cinco anos de cerca de 90% para MF em estágio inicial (IA e IB) e de 44% para aqueles em estádios mais avançados (IIB e IVB). O acometimento linfonodal e a transformação para grandes células mostrou prognóstico pior, com 20 a 30% e 38,5% de sobrevida em cinco anos, respectivamente^{20,38,64}.

Este estudo mostrou-se consistente com outros dados da literatura em relação a pacientes com MF em estágio inicial sem envolvimento linfonodal⁴⁵. Porém, a taxa de sobrevida em cinco anos foi divergente em pacientes com acometimento linfonodal (70,1%), sendo maior do que aquela relatada na literatura (20 a 30%).

Uma vez que a MF e a SS geralmente dependem de avaliação multidisciplinar para seu diagnóstico e têm curso clínico indolente, decidimos estudar mais de um momento ao longo do acompanhamento dos pacientes. Foram então definidos três tempos para coleta e avaliação dos dados: tempo inicial (na admissão do paciente com suspeita de linfoma cutâneo); tempo intermediário (tempo mais próximo à mediana de acompanhamento em que foi realizada coleta de biópsia) e desfecho (última intervenção ou atendimento). Em alguns casos, principalmente do grupo controle de dermatoses inflamatórias e SS, foram obtidos dados de apenas dois tempos, sendo considerado o último como desfecho para fins de análise. Talvez esse fato seja devido à resposta terapêutica nas condições inflamatórias e ao diagnóstico mais célere associado a rápida evolução dos casos de SS com consequente menor necessidade de biópsias de acompanhamento posteriores à admissão dos pacientes.

Os diagnósticos histopatológicos e imunohistoquímicos dessas condições são complexos, sendo muito relevante a experiência do patologista para o direcionamento e a conclusão diagnóstica em conjunto com o clínico. Todas as amostras de pele foram reanalisadas de acordo com parâmetros histopatológicos e imunohistoquímicos. Os resultados observados foram comparados com as descrições dos laudos originais no intuito de descentralizar a análise. Não houve casos com grande discordância utilizando-se a análise semiquantitativa dos marcadores imunohistoquímicos (escores de cruces), já que se permite certa variabilidade entre as porcentagens.

Os critérios e escore histopatológico (Guitart et al.¹²), utilizados no estudo, tiveram importância significativa na identificação de casos que foram diagnosticados como linfoma cutâneo na avaliação progressiva, mostrando-se com boa sensibilidade. Isso se deve à facilidade de padronização dos achados histopatológicos mais importantes como características e densidade do infiltrado linfoide, epidermotropismo e atipias citológicas. O escore permitiu inclusive a conversão de descrições microscópicas em variáveis quantitativas para análise. Observou-se que o aumento do escore foi progressivo ao longo do acompanhamento, sendo apropriado seu uso em casos suspeitos para MF e SS. Já nas dermatoses inflamatórias e idiopáticas o escore se manteve estável ao longo do acompanhamento.

O perfil imunofenotípico foi semelhante àquele observado na literatura, com perda progressiva de marcadores de células T, principalmente do CD7, já nas fases iniciais, e alta relação CD4/CD8^{1,13,20,49}.

A perda de CD7 aumentou nas amostras de pacientes com comprometimento linfonodal e reduziu naqueles sem comprometimento nodal, ao longo do tempo. Uma explicação possível para este fato seria a progressão mais rápida da doença em pacientes com envolvimento nodal e a maior refratariedade a tratamentos, mantendo-se um maior número de linfócitos com perda da imunoexpressão de CD7 no microambiente tumoral. Já aqueles sem envolvimento nodal, por ter tido evolução mais lenta, com maior chances de tratamento e conseqüente remissão da doença, apresentou população de linfócitos não neoplásicos, com imunoexpressão de CD7 preservada, maior. Contudo, não houve relação desse marcador com progressão nodal da doença, sendo a diferença entre os dois grupos, com e sem envolvimento nodal, sem significância estatística. As amostras de pacientes sem linfoma cutâneo não tiveram redução na imunomarcção de células T.

Apesar de várias pesquisas com objetivo de identificar marcadores imunohistoquímicos e moleculares específicos, até o momento, não há padrão ouro para o diagnóstico da MF e SS. Isto pode ser exemplificado por um dos casos estudados de paciente com diagnóstico de MF tumoral ao desfecho, admitido aos 33 anos de idade e acompanhado até os 40 anos, no qual não se observou perda da imunoexpressão de CD8. Isso corrobora com alguns relatos de caso que observaram dupla positividade ou negatividade de CD4 e CD8^{51,52}. Além disso, muitos outros casos não tiveram ou tiveram perda leve da expressão de marcadores imunohistoquímicos de células T como o CD5 e CD7.

No âmbito de neoplasia linfoides, há estudos que relacionam a presença de macrófagos M2 com pior evolução da doença, como no caso do linfoma B difuso de grandes células^{82,83}, linfoma de Hodgkin clássico⁸¹ e linfomas T^{82,83,85,86,87}.

Entretanto, há poucos estudos na literatura a respeito dos macrófagos M2 no microambiente tumoral de linfomas cutâneos. Essas células são encontradas em maior número nos linfomas cutâneos em comparação com a pele normal e se correlacionam com pior prognóstico^{89,90,91}. No entanto, o aumento do número de M2 não é exclusivo de condições neoplásicas, sendo observado também em condições inflamatórias, o que foi por nós confirmado pela análise dessas células no grupo controle composto por dermatoses de origem inflamatória ou idiopática.

A identificação tecidual de subtipos de macrófagos é controversa, uma vez que não há marcadores considerados específicos para a identificação de macrófagos M1 ou M2. A molécula CD163 é considerada por muitos autores como marcador específico de macrófagos M2. No entanto, há divergência na literatura a respeito dessa especificidade^{77,100,101}.

Com o intuito de aperfeiçoar e aumentar a especificidade da identificação imunohistoquímica de macrófagos M2 em nosso estudo optamos por realizar a técnica de dupla-marcação com o marcador para antígeno de superfície e citoplasmático CD163 e o fator de transcrição nuclear c-MAF que é relacionado à produção de IL-10^{84,102,103}.

A técnica de dupla marcação imunohistoquímica utilizada para pesquisa de macrófagos M2 em biópsias por punch se revelou inicialmente complexa em sua padronização. A necessidade de repetições das reações, associada à exiguidade de amostras foram fatores que dificultaram a análise proposta. Além disso, o cromógeno azul, escolhido para a reação com o

anticorpo CD163 com marcação membranosa e citoplasmática apresentou rápido esmaecimento. Uma solução adotada foi o escaneamento eletrônico com digitalização das lâminas para armazenamento e análise posterior das imagens. Apesar dessas dificuldades encontradas pudemos analisar e quantificar 134 amostras dos pacientes ao longo dos períodos de observação propostos.

Os macrófagos M2 evidenciados pela dupla marcação CD163/c-MAF mostraram-se presentes em meio ao infiltrado inflamatório dérmico tanto das amostras do grupo controle, como daquelas de MF e SS.

A maioria dos TAMs apresenta fenótipo M2 e estão relacionados ao crescimento e progressão tumoral devido a sua produção de interleucinas, prostaglandinas e fatores de crescimento que promovem o desenvolvimento e imunossupressão tumoral, além da produção de fatores angiogênicos, com conseqüente proliferação vascular e promoção da disseminação neoplásica^{16,70,72,73,74,89}.

Embora não tenhamos realizado a imunomarcação para endotélio vascular sanguíneo e linfático, assim como para marcadores de neoangiogênese, chamou-nos a atenção que, nas amostras de MF e SS, os macrófagos M2 mostraram-se abundantes em associação a focos de proliferação vascular dérmica, muitas vezes envolvendo e permeando a parede dessas estruturas vasculares, como demonstrado na Figura 17.

De maneira geral, o número de macrófagos M2/mm² aumentou ao longo da evolução de pacientes com linfoma e diminuiu naqueles com condições inflamatórias. Contudo, não observamos diferença significativa entre os grupos.

Com o objetivo de eliminar da análise qualquer tipo de interferência ou intervenção a qual o paciente possa ter sido submetido ao longo do acompanhamento, consideramos somente a densidade de macrófagos M2 das amostras coletadas na sua admissão para comparação dos grupos em relação ao comprometimento linfonodal. As amostras de pele do grupo de pacientes que evoluíram com comprometimento linfonodal tiveram maior quantidade de macrófagos, com média de $433,6 \pm 143,7$ macrófagos M2/mm². Já aqueles sem envolvimento nodal apresentaram média de $273,7 \pm 98,92$ macrófagos M2/mm². As dermatoses inflamatórias ou idiopáticas tiveram também número elevado de macrófagos, com média de $411,1 \pm 103,4$ macrófagos M2/mm².

De acordo com os resultados obtidos, a intensidade da população de macrófagos M2, embora não tenha diferenciado os processos de natureza inflamatória da MF e SS, pôde discriminar os casos de linfoma que evoluíram com envolvimento linfonodal.

A especificidade e sensibilidade da densidade de macrófagos M2 no microambiente cutâneo como possível preditor de envolvimento linfonodal nos casos de MF e SS foi confirmada à análise pela curva de características operacionais (ROC)¹⁰⁴. Além disso, com base nos dados obtidos estabelecemos o índice de Youden ($J=0,527$) para definir um ponto de corte, que foi de ≥ 333 macrófagos/mm².

As amostras de pele foram separadas por grupos segundo o ponto de corte de ≥ 333 macrófagos M2/mm² e foi observada diferença significativa ($p=0,026$; Odds ratio: 10,8; 95% IC [1,58 a 65,9]), o que sugere uma associação positiva entre o envolvimento nodal e a presença de ≥ 333 macrófagos M2/mm² na biópsia de pele na admissão dos indivíduos analisados. No entanto, é importante lembrar que a associação não implica necessariamente causalidade. Outros fatores devem ser considerados ao interpretar os resultados, principalmente por se tratar de estudo com número baixo de indivíduos.

Não há, até o momento, qualquer estudo na literatura que relacione a densidade de macrófagos M2 no microambiente tumoral cutâneo da MF e SS com o envolvimento linfonodal por esses linfomas, o que torna esse estudo uma fonte inicial de parâmetros para pesquisas neste sentido.

A otimização de técnica imunohistoquímica de dupla marcação^{84,103} mostrou-se factível na demonstração dos macrófagos M2 em material embebido em parafina. É técnica reprodutível e acessível para ser introduzida na rotina de análise imunohistoquímica.

Nosso estudo, guardadas as ressalvas do tamanho da casuística, pode estabelecer o ponto de corte de ≥ 333 macrófagos/mm² como um possível preditor de envolvimento linfonodal a ser verificado na primeira abordagem diagnóstica dos pacientes com MF e SS.

Os resultados obtidos abrem um novo caminho de pesquisa que talvez corrobore para o embasamento de novas terapias cujo objetivo seja inativação ou alteração de polarização de macrófagos^{16,94,95,96} ao diagnóstico inicial do processo linfomatoso a fim de evitar progressão e disseminação da doença.

7. CONCLUSÕES

A prevalência da MF e SS foi maior em homens com mediana de idade ao diagnóstico entre 53 e 54 anos, sendo o estágio inicial IIA. A mediana do tempo de acompanhamento foi de 92,5 meses e chegou ao máximo de 279,6 meses.

Quanto à evolução do estadiamento dos indivíduos com MF e SS, observou-se diferença com significância estatística apenas na comparação entre os grupos analisados na categoria N ($p= 0,0376$).

A sobrevida dos pacientes em cinco anos foi de 70,1% para aqueles com comprometimento linfonodal e 88,8% para aqueles sem comprometimento linfonodal; entretanto, sem diferença significativa.

Nos casos de SS, os diagnósticos anatomopatológicos e imunohistoquímicos iniciais de dermatites foram mais frequentes em comparação com os demais.

A MF foliculotrópica foi a variante em que se observou melhor concordância entre a avaliação inicial e o diagnóstico final.

O escore histopatológico de Guitart et al.¹² dos grupos de MF e SS aumentou ao longo do acompanhamento, com diferença significativa entre a admissão e o desfecho para ambos os grupos ($p= 0,012$ e $p= 0,029$, respectivamente). Entretanto, este não diferiu quando se considerou o envolvimento linfonodal dos pacientes.

O perfil imunofenotípico se altera ao longo da evolução de pacientes com MF e SS com perda precoce de expressão de CD7 daqueles que tiveram comprometimento linfonodal ($p<0,001$). A relação CD4/CD8, apesar de aumentar nos pacientes com linfoma cutâneo, não alcançou diferença significativa.

Não foram observadas diferenças no número de macrófagos M2/mm² das amostras das lesões de pele de pacientes com linfoma cutâneo, tanto iniciais como ao longo do acompanhamento, quanto ao desfecho de morte.

A análise da densidade de macrófagos M2 nas amostras de pele de MF e SS revelou aumento progressivo do número médio dessas células por mm² ao longo do acompanhamento, porém sem significância estatística ($p= 0,461$).

Não houve diferença significativa entre o número de macrófagos M2/mm² do microambiente das amostras de pele do grupo controle (dermatoses inflamatórias ou idiopáticas) com o do grupo de MF e SS.

A média de macrófagos M2/mm² das amostras de pele da admissão de pacientes com MF e SS foi maior naqueles que apresentaram envolvimento linfonodal ($p = 0,024$).

Os resultados obtidos permitiram estabelecer a média de ≥ 333 macrófagos/mm² no ambiente cutâneo dos casos de MF e SS estudados, como possível preditor de envolvimento linfonodal.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Jawed SI, Myskowski PL, Horwitz S, Moskowitz A, Querfeld C. Primary cutaneous T-cell lymphoma (mycosis fungoides and Sézary syndrome): part I. Diagnosis: clinical and histopathologic features and new molecular and biologic markers. *J Am Acad Dermatol*. 2014;70(2):205.e1-205.e16.
2. Jawed SI, Myskowski PL, Horwitz S, Moskowitz A, Querfeld C. Primary cutaneous T-cell lymphoma (mycosis fungoides and Sézary syndrome): part II. Prognosis, management, and future directions. *J Am Acad Dermatol*. 2014;70(2):223.e1-223.e17.
3. Hodak E, Klein T, Gabay B, Ben-Amitai D, Bergman R, Gdalevich M, et al. Familial mycosis fungoides: report of 6 kindreds and a study of the HLA system. *J Am Acad Dermatol*. 2005;52(3):393-402.
4. Hodak E, Friedman E. Familial mycosis fungoides: model of genetic susceptibility. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2010;10:S67-S69.
5. Schneider BF, Thomas C, Glusac EJ, McNiff JM. Familial occurrence of cutaneous T cell lymphoma: a case report of monozygotic twin sisters. *Leukemia*. 1995;9(11):1979-1981.
6. Odum N, Lindahl LM, Wod M, Krejsgaard T, Skytthe A, Woetmann A, et al. Investigating heredity in cutaneous T-cell lymphoma in a unique cohort of Danish twins. *Blood Cancer J*. 2017;7(1):e517.
7. Willerslev-Olsen A, Krejsgaard T, Lindahl LM, Litvinov IV, Fredholm S, Petersen DL, et al. Staphylococcal enterotoxin A (SEA) stimulates STAT3 activation and IL-17 expression in cutaneous T-cell lymphoma. *Blood*. 2016;127(10):1287-1296.
8. Mirvish ED, Pomerantz RG, Geskin LJ. Infectious agents in cutaneous T-cell lymphoma. *J Am Acad Dermatol*. 2011;64(2):423-431.
9. Campbell JJ, Clark RA, Watanabe R, Kupper TS. Sezary syndrome and mycosis fungoides arise from distinct T-cell subsets: a biologic rationale for their distinct clinical behaviors. *Blood*. 2010;116(5):767-71.
10. González BR, Ortiz-Romero PL, Fernández-López E, Marinas C, Pérez-González YC, Tomás JF, et al. Tumor microenvironment in mycosis fungoides and Sezary syndrome. *Curr Opin Oncol*. 2016;28(1):88-96.
11. Cerroni L. *Skin lymphoma: the illustrated guide*. John Wiley & Sons; 2020. 150p.
12. Guitart J, Kennedy J, Ronan S, Chmiel JS, Hsiegh YC, Kadin ME. 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.

13. Pimpinelli N, Olsen EA, Santucci M, Vonderheid E, Haeffner AC, Stevens S, et al. Defining early mycosis fungoides. *J Am Acad Dermatol*. 2005;53:1053-1063.
14. Vandergriff T, Nezafati KA, Susa J, Karai L, Sanguinetti A, Hynan LS, et al. Defining early mycosis fungoides: validation of a diagnostic algorithm proposed by the International Society for Cutaneous Lymphomas. *J Cutan Pathol*. 2015;42(5):318-328.
15. Nardin A, Abastado JP. Macrophages and cancer. *Front Biosci*. 2008;13:3494-3505.
16. Lü MH, Fan YH, Cao YL, Zhang ZR, Yang SM. Macrophages in tumor microenvironments and the progression of tumors. *Clin Dev Immunol*. 2012;2012:948098.
17. Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J Immunol*. 2000;164(12):6166-6173.
18. Smith A, Crouch S, Lax S, Li J, Painter D, Howell D, et al. Lymphoma incidence, survival and prevalence 2004-2014: sub-type analyses from the UK's Haematological Malignancy Research Network. *Br J Cancer*. 2015;112(9):1575-1584.
19. Willemze R, Jaffe ES, Burg G, Cerroni L, Berti E, Swerdlow SH, et al. WHO-EORTC classification for cutaneous lymphomas. *Blood*. 2005;105(10):3768-3785.
20. Willemze R, Cerroni L, Kempf W, Berti E, Facchetti F, Swerdlow SH, Jaffe ES. The 2018 update of the WHO-EORTC classification for primary cutaneous lymphomas. *Blood*. 2019;133(16):1703-1714.
21. Miyashiro D, Sanches JA. Mycosis fungoides and Sézary syndrome: clinical presentation, diagnosis, staging and therapeutic management. *Front Oncol*. 2023;13:1503.
22. Bradford PT, Devesa SS, Anderson WF, Toro JR. Cutaneous lymphoma incidence patterns in the United States: a population-based study of 3884 cases. *Blood*. 2009;113(21):5064-5073.
23. Criscione VD, Weinstock MA. Incidence of cutaneous T-cell lymphoma in the United States, 1973-2002. *Arch Dermatol*. 2007;143(7):854-9.
24. Korgavkar K, Xiong M, Weinstock M. Changing incidence trends of cutaneous T-cell lymphoma. *JAMA Dermatol*. 2013;149(11):1295-1299.
25. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. *Estimativa 2018: Incidência de Câncer no Brasil*. Rio de Janeiro. 2017.
26. Miyashiro DR. *Micose fungoide e síndrome de Sézary: caracterização demográfica, clínica, histopatológica, imunopatológica, molecular, laboratorial e evolutiva de coorte observada no ambulatório de linfomas*. [Tese de doutorado]. Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2021. Acesso em: 2023-02-05.

27. Kim YH, Liu HL, Mraz-Gernhard S, Varghese A, Hoppe RT. Long-term outcome of 525 patients with mycosis fungoides and Sezary syndrome: clinical prognostic factors and risk for disease progression. *Arch Dermatol*. 2003;139(7):857–66.
28. Scarisbrick JJ, Quaglino P, Prince HM, Kim YH, Willemze Rinvestigators P. Ethnicity in mycosis fungoides: white patients present at an older age and with more advanced disease. *Br J Dermatol*. 2019;180(5):1264–5.
29. Zampella JG, Hinds GA. Racial differences in mycosis fungoides: a retrospective study with a focus on eosinophilia. *J Am Acad Dermatol*. 2013;68(6):967-971.
30. Kubica AW, Davis MD, Weaver AL, Killian JM, Pittelkow MR. Sezary syndrome: a study of 176 patients at Mayo clinic. *J Am Acad Dermatol*. 2012;67(6):1189–99.
31. Pope E, Weitzman S, Ngan B, Walsh S, Moretta A, Abenzoza P, et al. Mycosis fungoides in the pediatric population: report from an international Childhood Registry of Cutaneous Lymphoma. *J Cutan Med Surg*. 2010;14(1):1-6.
32. Rodney IJ, Kindred C, Angra K, Qutub ON, Villanueva AR, Halder RM. Hypopigmented mycosis fungoides: a retrospective clinicohistopathologic study. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2017;31(5):808–14.
33. Schmidt AN, Davis G, Beckham TH, Browne A, Lesniak A, Grewal RK, Kline R. Conjugal transformed mycosis fungoides: the unknown role of viral infection and environmental exposures in the development of cutaneous T-cell lymphoma. *J Am Acad Dermatol*. 2006;54(5):S202-S205.
34. Emadi SN, Nosrati H, Mortazavi H, Hajizadeh M, Mousavi A, Moradi A, Ghazanfari T. Mycosis fungoides two decades after exposure to sulphur mustard: a follow-up of 1100 victims. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2017;31(3):432-7.
35. Talpur R, Cox KM, Hu M, Geddes ER, Parker MK, Yang BY, et al. Vitamin d deficiency in mycosis fungoides and sezary syndrome patients is similar to other cancer patients. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2014;14(6):518–24.
36. Clough L, Bayakly AR, Ward KC, Khan MK, Chen SC, Lechowicz MJ, et al. Clustering of cutaneous T-cell lymphoma is associated with increased levels of the environmental toxins benzene and trichloroethylene in the state of Georgia. *Cancer*. 2020;126(8):1700–7.
37. Jones CL, Degasperi A, Grandi V, Amarante TD Genomics England Research C, , Mitchell TJ, et al. Spectrum of mutational signatures in T-cell lymphoma reveals a key role for UV radiation in cutaneous T-cell lymphoma. *Sci Rep*. 2021;11(1):3962.

38. Scarisbrick JJ, Prince HM, Vermeer MH, Quaglino P, Horwitz S, Porcu P, et al. Cutaneous Lymphoma International Consortium study of outcome in advanced stages of mycosis fungoides and Sézary syndrome: effect of specific prognostic markers on survival and development of a prognostic model. *J Clin Oncol*. 2015;33(32):3766-3773.
39. Meyer N, Paul C, Misery L. Pruritus in cutaneous T-cell lymphomas: frequent, often severe and difficult to treat. *Acta Derm Venereol*. 2010;90(1):12-17.
40. Bishop BE, Maiberger M, Thornton L, Hossler EW. Nail alterations in cutaneous T-cell lymphoma: a case series and review of nail manifestations. *Skin Appendage Disord*. 2015;1(2):82-6.
41. Massone C, Crisman G, Kerl H, Cerroni L. Histopathologic features of early (patch) lesions of mycosis fungoides: a morphologic study on 745 biopsy specimens from 427 patients. *Am J Surg Pathol*. 2005;29(4):550-560.
42. 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.
43. Raghavan SS, Hong EK, Kim YH, Kim J. Utility of CD30, ki-67, and p53 in assisting with the diagnosis of mycosis fungoides with large cell transformation. *J Cutan Pathol*. 2019;46(1):33–43.
44. Kirsch IR, Watanabe R, O'Malley JT, Williamson DW, Scott LL, Elco CP, et al. TCR sequencing facilitates diagnosis and identifies mature T cells as the cell of origin in CTCL. *Sci Transl Med*. 2015;7(308):308ra158.
45. Amorim GM, Niemeyer-Corbellini JP, Quintella DC, Cuzzi T, Ramos-e-Silva M. Clinical and epidemiological profile of patients with early stage mycosis fungoides. *An Bras Dermatol*. 2018;93:546-552.
46. Ryu HJ, Kim SI, Jang HO, Kim SH, Oh SH, Park S, et al. Evaluation of the International Society for Cutaneous Lymphoma algorithm for the diagnosis of early mycosis fungoides. *Cells*. 2021;10(10):2758.
47. Krishnasamy S, Correia E, Kartan S, Wang X, Porcu P, Cha J, et al. Application of the current diagnostic algorithm for early mycosis fungoides to a single center cohort: Identification of challenges and suggestions for modification. *J Cutan Pathol*. 2022;49(9):772-779.

48. Vega F, Medeiros LJ. A suggested immunohistochemical algorithm for the classification of T-cell lymphomas involving lymph nodes. *Hum Pathol*. 2020;102:104-116.
49. Dewar R, Fuda F, Hoda S, Wilcox R, Elenitoba-Johnson KSJ. Best practices in diagnostic immunohistochemistry: workup of cutaneous lymphoid lesions in the diagnosis of primary cutaneous lymphoma. *Arch Pathol Lab Med*. 2015;139(3):338-50.
50. Karabulut YY, Dinç U, Köse EÇ, Türsen Ü. Deep learning as a new tool in the diagnosis of mycosis fungoides. *Arch Dermatol Res*. 2022;1-8.
51. Tournier E, Laurent C, Fraitag S, Durlach A, de Muret A, Carlotti A, et al. Double-positive CD4/CD8 mycosis fungoides: a rarely reported immunohistochemical profile. *J Cutan Pathol*. 2014;41(1):58-62.
52. Ito A, Kodama Y, Sugiura K, Aoki M, Shiohara T. CD4/CD8 Double-negative Mycosis Fungoides: A Case Report and Literature Review. *Yonago Acta Med*. 2019;62(1):153-158.
53. Walsh NM, Prokopetz R, Tron VA, Sawyer DM, Murray S, Hudon C, et al. Histopathology in erythroderma: review of a series of cases by multiple observers. *J Cutan Pathol*. 1994;21(5):419-423.
54. Çetinözman F, Jansen PM, Vermeer MH, Willemze R. Differential expression of programmed death-1 (PD-1) in Sézary syndrome and mycosis fungoides. *Arch Dermatol*. 2012;148(12):1379-85.
55. Hurabielle C, Michel L, Ram-Wolff C, Battistella M, Sadoux A, Carlotti A, et al. Usefulness of KIR3DL2 to diagnose, follow-up, and manage the treatment of patients with Sézary syndrome. *Clin Cancer Res*. 2017;23(14):3619-3627.
56. Michel L, Jean-Louis F, Begue E, Bensussan A, Bagot M. Use of PLS3, Twist, CD158k/KIR3DL2, and NKp46 gene expression combination for reliable Sézary syndrome diagnosis. *Blood*. 2013;121(8):1477-1478.
57. Boonk SE, Zoutman WH, Marie-Cardine A, van der Fits L, Out-Luiting JJ, et al. Evaluation of immunophenotypic and molecular biomarkers for Sezary syndrome using standard operating procedures: a multicenter study of 59 patients. *J Invest Dermatol*. 2016;136(7):1364-72.
58. Elenitoba-Johnson KSJ, Wilcox RA. A new molecular paradigm in mycosis fungoides and Sezary syndrome. *Semin Diagn Pathol*. 2017;34(1):15-21.
59. Chevret E, Merlio JP. Sézary syndrome: translating genetic diversity into personalized medicine. *J Invest Dermatol*. 2016;136(7):1319-24.

60. Scarisbrick JJ, Quaglino P, Prince HM, Papadavid E, Hodak E, Bagot M, et al. Blood classification and blood response criteria in mycosis fungoides and Sézary syndrome using flow cytometry: recommendations from the EORTC cutaneous lymphoma task force. *Eur J Cancer*. 2018;93:47-56.
61. Hristov AC, Tejasvi T, Wilcox RA. Cutaneous T-cell lymphomas: 2023 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol*. 2023;98(1):193–209.
62. Vonderheid E, Pimpinelli N, Willemze R, Kim Y, Knobler R, Zackheim H, 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):1713-1722.
63. Sanches JA, Dantas DC, Barreto JA, Ogata MS, Fregnani JH, Varela PC. Micose fungoide e síndrome de Sézary: foco no cenário atual de tratamento. *An Bras Dermatol*. 2021;96(4):458-471.
64. Agar NS, Wedgeworth E, Crichton S, Mitchell TJ, Cox M, Ferreira S, et al. Survival outcomes and prognostic factors in mycosis fungoides/Sézary syndrome: validation of the revised International Society for Cutaneous Lymphomas/European Organisation for Research and Treatment of Cancer staging proposal. *J Clin Oncol*. 2010;28(31):4730-9.
65. Cesar A, Cruz M, Mota A, Azevedo F. Erythroderma. a clinical and etiological study of 103 patients. *J Dermatol Case Rep*. 2016;10(1):1–9.
66. Mori K, Haraguchi S, Hiori M, Shimada J, Ohmori Y. Infiltration of M2 tumor-associated macrophages in oral squamous cell carcinoma correlates with tumor malignancy. *Cancers*. 2011;3(4):3726-3739.
67. Costa NL, Valadares MC, Souza PPC, Mendonça EF, Oliveira JC, Silva TA, et al. Tumor-associated macrophages and the profile of inflammatory cytokines in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*. 2013;49(3):216-23.
68. Zhang Q, Wei H, Tian Z. Prognostic significance of tumor-associated macrophages in solid tumor: a meta-analysis of the literature. *PLoS One*. 2012;7(12):e50946.
69. Bingle L, Brown NJ, Lewis CE. The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. *J Pathol*. 2002;196(3):254-65.
70. Pileri A, Guglielmo A, Grandi V, Violetti SA, Fanoni D, Fava P, et al. The microenvironment's role in mycosis fungoides and Sézary syndrome: from progression to therapeutic implications. *Cells*. 2021;10(10):2780.

71. Miyagaki T, Sugaya M, Suga H, Morimura S, Ohmatsu H, Fujita H, et al. Increased CCL18 expression in patients with cutaneous T-cell lymphoma: association with disease severity and prognosis. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2013;27(1):e60-e67.
72. Guruvayoorappan C. Tumor versus tumor-associated macrophages: how hot is the link? *Integr Cancer Ther*. 2008;7(2):90-95.
73. Gabrilovich DI, Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2009;9(3):162-74.
74. De Palma M, Lewis CE. Macrophage regulation of tumor responses to anticancer therapies. *Cancer Cell*. 2013;23(3):277-86.
75. Leek RD, Lewis CE, Whitehouse R, Greenall M, Clarke J, Harris AL. Association of macrophage infiltration with angiogenesis and prognosis in invasive breast carcinoma. *Cancer Res*. 1996;56(20):4625-4629.
76. Clear AJ, Lee AM, Calaminici M, Ramsay AG, Gribben JG, Lister TA, Goff LK. Increased angiogenic sprouting in poor prognosis FL is associated with elevated numbers of CD163+ macrophages within the immediate sprouting microenvironment. *Blood*. 2010;115(24):5053-6.
77. Heusinkveld M, van der Burg SH. Identification and manipulation of tumor associated macrophages in human cancers. *J Transl Med*. 2011;9(1):216.
78. Etzerodt A, Tsalkitzi K, Maniecki M, Damsky W, Delfini M, Baudoin E, et al. Specific targeting of CD163+ TAMs mobilizes inflammatory monocytes and promotes T cell-mediated tumor regression. *J Exp Med*. 2019;216(10):2394-411.
79. Lee WJ, Lee YJ, Choi ME, Yun SJ. Prognostic significance of CD163 expression and its correlation with cyclooxygenase-2 and vascular endothelial growth factor expression in cutaneous melanoma. *Melanoma Res*. 2019;29(5):501-509.
80. Failing JJ, Yan Y, Porrata LF, Lunning M, Markovic SN. Lymphocyte-to-monocyte ratio is associated with survival in pembrolizumab-treated metastatic melanoma patients. *Melanoma Res*. 2017;27(6):596-600.
81. Kurahara H, Shinchi H, Mataka Y, Maemura K, Noma H, Kubo F, et al. M2-polarized tumor-associated macrophage infiltration of regional lymph nodes is associated with nodal lymphangiogenesis and occult nodal involvement in pN0 pancreatic cancer. *Pancreas*. 2013;42(1):155-159.

82. Wada N, Zaki MA, Hori Y, Hashimoto K, Tsukaguchi M, Tatsumi Y, et al. Tumour-associated macrophages in diffuse large B-cell lymphoma: a study of the Osaka Lymphoma Study Group. *Histopathology*. 2012;60(2):313-319.
83. Marchesi F, Cirillo M, Bianchi A, Gately M, Olimpieri OM, Cerchiara E, et al. High density of CD68+/CD163+ tumour-associated macrophages (M2-TAM) at diagnosis is significantly correlated to unfavorable prognostic factors and to poor clinical outcomes in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Hematol Oncol*. 2015;33(2):110-112.
84. Barros MHM, Hauck F, Dreyer JH, Kempkes B, Niedobitek G. Macrophage polarisation: an immunohistochemical approach for identifying M1 and M2 macrophages. *PLoS One*. 2013;8(11):e80908.
85. Zaki MA, Wada N, Ikeda J, Shibayama H, Hashimoto K, Yamagami T, et al. Prognostic implication of types of tumor-associated macrophages in Hodgkin lymphoma. *Virchows Arch*. 2011;459(4):361-366.
86. Ham JS, Park HY, Ryu KJ, Ko YH, Kim WS, Kim SJ. Elevated serum interleukin-10 level and M2 macrophage infiltration are associated with poor survival in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Oncotarget*. 2017;8(44):76231.
87. Niino D, Komohara Y, Murayama T, Aoki R, Kimura Y, Hashikawa K, et al. Ratio of M2 macrophage expression is closely associated with poor prognosis for Angioimmunoblastic T-cell lymphoma (AITL). *Pathol Int*. 2010;60(4):278-283.
88. Komohara Y, Niino D, Ohnishi K, Ohshima K, Takeya M. Clinical significance of CD163+ tumor-associated macrophages in patients with adult T-cell leukemia/lymphoma. *Cancer Sci*. 2013;104(7):945-951.
89. Sugaya M, Miyagaki T, Ohmatsu H, Suga H, Kai H, Kamata M, et al. Association of the numbers of CD163+ cells in lesional skin and serum levels of soluble CD163 with disease progression of cutaneous T cell lymphoma. *J Dermatol Sci*. 2012;68(1):45-51.
90. Wu X, Schulte BC, Zhou Y, Haribhai D, Mackinnon AC, Plaza JA, et al. Depletion of M2-like tumor-associated macrophages delays cutaneous T-cell lymphoma development in vivo. *J Invest Dermatol*. 2014.
91. Furudate S, Fujimura T, Kambayashi Y, Kakizaki A, Hidaka T, Aiba S. The possible interaction between periostin expressed by cancer stroma and tumor-associated macrophages in developing mycosis fungoides. *Exp Dermatol*. 2016;25(2):107-12.
92. Tse E, Kwong YL. T-cell lymphoma: Microenvironment-related biomarkers. *Semin Cancer Biol*. 2015;34:46-51.

93. Mitchem JB, Brennan DJ, Knolhoff BL, Belt BA, Zhu Y, Sanford DE, et al. Targeting tumor-infiltrating macrophages decreases tumor-initiating cells, relieves immunosuppression, and improves chemotherapeutic responses. *Cancer Res.* 2013;73(3):1128-1141.
94. Pyonteck SM, Akkari L, Schuhmacher AJ, Bowman RL, Sevenich L, Quail DF, et al. CSF-1R inhibition alters macrophage polarization and blocks glioma progression. *Nat Med.* 2013;19(10):1264-1272.
95. Ruffell B, Coussens LM. Macrophages and therapeutic resistance in cancer. *Cancer Cell.* 2015;27(4):462-472.
96. Suda K. Tumor-associated macrophages—additional effectors at anti-PD-1/PD-L1 therapy?. *J Thorac Dis.* 2017;9(11):4197.
97. Krieg AM. Therapeutic potential of Toll-like receptor 9 activation. *Nat Rev Drug Discov.* 2006;5(6):471-484.
98. Jinushi M, Komohara Y. Tumor-associated macrophages as an emerging target against tumors: Creating a new path from bench to bedside. *Biochim Biophys Acta.* 2015;1855(2):123-130.
99. Komohara Y, Fujiwara Y, Ohnishi K, Takeya M. Tumor-associated macrophages: potential therapeutic targets for anti-cancer therapy. *Adv Drug Deliv Rev.* 2016;99(Pt B):180-185.
100. Lau SK, Chu PG, Weiss LM. CD163: A specific marker of macrophages in paraffin-embedded tissue samples. *Am J Clin Pathol.* 2004;122(5):794-801.
101. Nguyen TT, Schwartz EJ, West RB, Warnke RA, Arber DA, Natkunam Y. Expression of CD163 (hemoglobin scavenger receptor) in normal tissues, lymphomas, carcinomas, and sarcomas is largely restricted to the monocyte/macrophage lineage. *Am J Surg Pathol.* 2005;29(5):617-624.
102. Cao S, Liu J, Song L, Ma X. The protooncogene c-Maf is an essential transcription factor for IL-10 gene expression in macrophages. *J Immunol.* 2005;174(6):3484-92.
103. Pereira NV. *Macrófagos polarizados M2 na resposta tecidual das lesões cutâneas da leishmaniose tegumentar americana* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina; 2018 [citado 2023-04-16].
104. Hosmer Jr, David W., Stanley Lemeshow, and Rodney X. Sturdivant. *Applied logistic regression*. Vol. 398. John Wiley & Sons, 2013.

9. ANEXOS

Anexo 1 - Relatório de aprovação da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAPPesq-HCFMUSP)



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: MACRÓFAGOS M2 NO MICROAMBIENTE CUTÂNEO E DE LINFONODO NA MICOSE FUNGOIDE E NA SÍNDROME DE SÉZARY

Pesquisador: Mirian Nacagami Sotto

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 79177517.2.0000.0068

Instituição Proponente: HOSPITAL DAS CLINICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA U S P

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.366.661

Apresentação do Projeto:

Análise retrospectiva que visa avaliar a relação entre a progressão tumoral e população de macrófagos M2 na micose fungoide e Síndrome de Sézary.

Objetivo da Pesquisa:

Investigar a presença de macrófagos M2 no microambiente das lesões de pele e linfonodos (comprometidos e não comprometidos) de pacientes com Micose fungoide e Síndrome de Sézary, e verificar se essa população macrofágica tem relação com a progressão da doença evidenciada pelo comprometimento extracutâneo (linfonodal). Serão analisados 60 espécimes.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não há riscos por se tratar de estudo retrospectivo (amostras já coletadas). Não há benefícios diretos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Serão avaliadas biópsias de pele com diagnóstico comprovado de micose fungoide e de síndrome de Sezary que tiveram linfonodo ressecado para estadiamento. O grupo controle será constituído por espécimes pele e linfonodos retirados de doentes com eritrodermia, que durante a avaliação etiológica do processo, cujo diagnóstico clínico/laboratorial e evolutivo não resultou no diagnóstico de micose fungoide ou de síndrome de Sezary.

Os espécimes de pele serão selecionados a partir dos arquivos do Laboratório de

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira César **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br



USP - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE



Continuação do Parecer: 2.366.661

Dermatopatologia da Divisão de Clínica Dermatológica do Hospital da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e os espécimes de linfonodo dos arquivos da Divisão de Anatomia Patológica (DAP) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os dados clínicos, epidemiológicos e laboratoriais relevantes dos pacientes serão obtidos das fichas de requisição de exame anatomopatológico e por consulta de seus prontuários.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Pode haver dispensa de TCLE, por se tratar de estudo retrospectivo – biópsias de pele e linfonodos já realizadas. Material biológico armazenado na Divisão de Clínica Dermatológica e Divisão de patologia do HCFMUSP. Muitos pacientes já faleceram ou não se encontram mais em segmento no HCFMUSP.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Nada a declarar. Aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

Em conformidade com a Resolução GNS nº 466/12 – cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_969603.pdf	20/10/2017 14:05:06		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	M2_MF_SS.doc	20/10/2017 14:04:38	Mirian Nacagami Sotto	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Cartas_anuencia.pdf	18/09/2017 13:20:03	Mirian Nacagami Sotto	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento /	Solic_dispensa_TCLE.pdf	18/09/2017 13:18:24	Mirian Nacagami Sotto	Aceito

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
 Bairro: Cerqueira Cesar CEP: 05.403-010
 UF: SP Município: SAO PAULO
 Telefone: (11)2661-7585 Fax: (11)2661-7585 E-mail: ceppesq.adm@hc.fm.usp.br



Continuação do Parecer: 2.366.661

Justificativa de Ausência	Solic_dispenza_TCLE.pdf	18/09/2017 13:18:24	Mirian Nacagami Sotto	Aceito
Folha de Rosto	Folha_rosto_M2_MF_SS.pdf	18/09/2017 13:10:29	Mirian Nacagami Sotto	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SÃO PAULO, 06 de Novembro de 2017

Assinado por:

ALFREDO JOSE MANSUR
(Coordenador)

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
 Bairro: Cerqueira Cesar CEP: 05.403-010
 UF: SP Município: SÃO PAULO
 Telefone: (11)2661-7585 Fax: (11)2661-7585 E-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br

Anexo 2 - Tabelas

Tabela 1 - Diagnósticos dos pacientes ao longo do acompanhamento

Código	Sexo	Data (t1)	Diagnóstico (t1)	Data (t2)	Diagnóstico (t2)	Data (t3)	Diagnóstico (t3)	Diagnóstico final
1	M	27/09/2012	Dermatite de interface liquenóide	NA	NA	13/09/2013	Dermatite de interace liquenóide	Dermatose inflamatória
2	M	09/02/2015	Dermatite espongíotica	NA	NA	28/04/2015	Dermatite espongíotica	Dermatose inflamatória
3	M	25/03/2011	MF foliculotrópica	NA	NA	02/02/2015	MF	MF tumoral
4	F	18/03/2011	Linfoma t periférico	11/11/2014	Linfoma t periférico	04/08/2017	NA	MF tumoral
5	M	27/01/2010	MF	06/01/2016	MF tumoral	06/05/2021	NA	MF tumoral
6	M	23/02/2011	Sugestivo mf	10/04/2014	NA	02/11/2017	MF	MF tumoral
7	F	01/08/2006	NA	01/07/2014	MF foliculotrópica	12/07/2021	NA	MF folículoalotrópica
8	F	05/09/2008	MF foliculotrópica	01/07/2010	MF foliculotrópica	04/05/2021	NA	MF folículoalotrópica
9	F	22/12/2009	MF	20/04/2011	MF	10/12/2014	NA	SS
10	F	27/12/2011	MF	27/09/2012	MF	27/12/2016	NA	SS
11	F	10/02/2012	MF foliculotrópica	NA	NA	01/02/2014	NA	MF folículoalotrópica
12	F	29/12/2012	MF	19/03/2014	MF transformada	24/06/2021	NA	MF tumoral
13	M	01/03/2015	Dermatite espongíotica	01/05/2015	NA	14/04/2022	NA	SS
14	F	05/10/2012	Dermatite espongíotica	01/02/2013	NA	10/09/2019	NA	SS
15	M	01/03/2012	Dermatite espongíotica	NA	NA	NA	NA	Dermatose inflamatória
16	M	01/12/2012	Dermatite espongíotica	NA	NA	NA	NA	Dermatose inflamatória
17	F	01/01/2008	NA	18/12/2012	MF	15/04/2014	NA	SS
18	M	30/06/2014	MF	NA	NA	12/08/2014	MF	SS
19	M	01/01/2005	Sugestivo mf	27/02/2015	NA	12/05/2019	NA	MF eritrodermica
20	F	01/10/1992	MF foliculotrópica	15/12/2014	MF granulomatosa	08/01/2016	NA	MF tumoral
21	F	06/08/2014	MF foliculotrópica	17/02/2016	MF foliculotrópica	21/02/2019	NA	MF tumoral
22	F	11/05/2015	Linfoma t periférico	NA	NA	NA	NA	MF
23	F	01/04/2015	Cutis laxa granulomatosa	01/10/2016	NA	26/11/2016	NA	Cutis laxa
24	F	31/05/2016	MF foliculotrópica	14/07/2016	MF foliculotrópica	16/07/2018	NA	MF folículoalotrópica

25	F	07/10/2015	MF	NA	NA	NA	NA	MF
26	M	29/05/2015	Sugestivo mf	27/10/2017	NA	26/12/2017	NA	MF
27	F	01/10/2015	Dermatite psoriasiforme	01/10/2016	Dermatite psoriasiforme	04/02/2020	NA	SS
28	M	17/10/2016	MF transformada	10/11/2016	NA	15/07/2019	NA	MF tumoral
29	F	21/07/2016	Linfoma t periférico	03/11/2016	NA	18/02/2020	NA	MF eritrodermica
30	F	09/01/2017	Infiltrado t epidermotrópico	16/01/2017	NA	10/04/2018	NA	MF eritrodermica
31	F	11/08/2016	MF foliculotrópica	16/12/2016	NA	20/08/2019	NA	MF foliculotrópica
32	F	25/08/2009	MF	27/11/2014	MF	21/09/2021	NA	MF
33	M	21/08/2012	Linfoma t periférico	09/04/2014	Dermatite espongiótica e psoriasiforme	30/06/2015	NA	MF eritrodermica
34	F	16/01/2013	Linfoma t periférico	01/04/2018	MF	04/07/2019	NA	MF eritrodermica
35	F	13/05/2010	Linfoma t periférico	21/06/2012	MF	21/02/2017	MF transformada	MF tumoral
36	M	01/01/1988	NA	01/01/2009	Possibilidade mf	14/05/2019	NA	MF tumoral
37	M	29/07/2013	Mucinose folicular	29/10/2013	MF foliculotrópica	07/04/2015	Sugestivo mf	MF foliculotrópica
38	M	24/10/2013	Perifoliculite	10/03/2014	MF	03/06/2015	MF foliculotrópica	MF foliculotrópica
39	F	01/12/2014	NA	04/03/2016	MF transformada	22/03/2016	NA	MF
40	M	24/05/2010	NA	19/08/2010	MF	09/03/2021	NA	SS
41	F	17/02/2009	Linfoma t periférico	NA	NA	NA	NA	MF
42	M	23/06/2009	Dermatite de interface liquenóide	01/07/2009	NA	25/05/2018	NA	SS
43	M	30/10/2008	Sugestivo mf	NA	NA	03/03/2009	NA	MF eritrodermica
44	M	24/01/2007	Dermatite psoriasiforme	20/08/2010	Linfoma t periférico	30/08/2012	NA	SS
45	M	27/06/2008	Dermatite psoriasiforme	14/07/2010	Dermatite psoriasiforme	05/10/2021	NA	Dermatose inflamatória
46	F	20/05/2010	MF	26/08/2010	MF	02/08/2011	NA	SS
47	M	01/01/2012	Dermatite espongiótica	NA	NA	16/07/2013	NA	Dermatose inflamatória
48	M	21/12/2010	MF	21/12/2011	NA	18/03/2011	NA	SS
49	M	07/12/2009	Dermatite espongiótica	21/06/2010	Dermatite espongiótica	22/07/2010	Dermatite espongiótica	Dermatose inflamatória
50	F	10/11/2011	Sugestivo mf	24/11/2011	NA	20/07/2021	NA	SS
51	M	12/02/2003	NA	27/12/2010	MF	12/02/2011	NA	MF tumoral
52	M	28/04/2011	Farmacodermia	05/06/2012	Farmacodermia	NA	NA	Dermatose inflamatória

53	M	06/11/2008	Dermatite espongiótica	NA	NA	NA	NA	Dermatose inflamatória
54	M	19/10/2009	Dermatite psoriasiforme	NA	NA	NA	NA	Dermatose inflamatória
57	M	18/02/2009	Dermatite espongiótica	NA	NA	NA	NA	Dermatose inflamatória

NOTA: Código: código de identificação do paciente; T1: admissão; T2: tempo intermediário; T3; desfecho; NA: não se aplica (sem dados); MF: micose fungoide; SS: síndrome de Sézary

Tabela 2 - Estadio ISCL/EORTC (TNMB)^{20,60} dos pacientes ao longo dos três tempos de acompanhamento

Código	T (t1)	N (t1)	M (t1)	B (t1)	T (t2)	N (t2)	M (t2)	B (t2)	T (t3)	N (t3)	M (t3)	B (t3)
1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
2	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
3	3	1	0	0	X	X	X	X	X	X	X	X
4	2b	0	0	0	X	X	X	X	3	1	0	0
5	1b	0	0	0b	3	0	0	0b	3	0	0	0b
6	3	1	0	0	3	1	0	0	3	1	0	0
7	2b	1	0	0	2b	1	0	0	3	1	0	0
8	X	X	X	X	4	1	0	0	4	1	0	0
9	4	3	1	2	4	3	1	2	4	3	1	2
10	4	0	0	2	4	1	0	2	4	1	0	2
11	2b	0	0	0	X	X	X	X	2b	1	0	0
12	2b	1	0	0b	3	0	0	0b	3	1	0	0b
13	4	1b	0	2	4	1b	0	2	4	1b	0	2
14	X	X	X	X	4	1	0	2	4	3	0	2
15	X	0	0	0	X	X	X	X	X	X	X	X
16	X	0	0	0	X	X	X	X	X	X	X	X
17	X	X	X	X	3	3	0	2	3	3	0	2
18	4	3	0	2	X	X	X	X	4	3	0	2
19	4	X	X	X	4	1	0	0	4	1	0	0
20	2	1	0	0	3	3	X	0	X	X	X	X
21	2b	1b	0	0b	3	1b	0	1b	3	1b	0	1b
22	X	2	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
23	4	4	0	1b	3	1	0	1b	3	1	0	1b
24	2b	X	0	0a	2b	1a	0	0b	1b	1b	0	0
25	X	2	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
26	2b	0	0	0	2b	3	0	1a	2b	3	0	1a
27	4	0	0	2	4	1	0	2	4	1	0	X
28	3	1b	0	0b	3	1b	0	0b	3	1b	0	0b
29	4	0	0	0	4	3	0	0	X	X	X	X
30	4	X	0	1	4	2b	0	1b	4	2b	0	1b
31	2b	3	0	0b	2b	3	0	0b	3	3	0	0b
32	2b	0	0	0	2b	1	0	0	2b	1	0	0a
33	4	1	0	0	4	1a	0	0	4	1a	0	1a

34	4	0	0	0b	4	3	0	0b	4	3	0	0b
35	2a	0	0	0b	3	1b	0	0b	3	1b	0	0b
36	X	X	X	X	3	0	0	0	3	0	0	0
37	2b	X	0	0	2b	1	0	0	3	1b	0	0
38	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
39	2b	0	0	0	X	X	X	X	X	X	X	X
40	X	X	X	X	X	X	X	X	4	1b	0	2
41	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
42	4	1	0	2	4	1	0	2	4	3	0	2
43	4	3	1	0b	X	X	X	X	4	3	1	0b
44	X	X	X	X	X	X	X	X	4	1b	0	2
45	X	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
46	4	1	0	2	4	1	0	2	4	1	0	2
47	2	1	0	0	X	X	X	X	2	0	0	0
48	4	3	X	2	4	3	X	2	4	3	1	2
49	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
50	4	2b	0	2	3	2b	0	2	4	2b	0	2
51	2b	0	0	0	3	3	0	0b	3	3	0	0b
52	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
53	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
54	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
57	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

NOTA: Código: código de identificação do paciente; T1: admissão; T2: tempo intermediário; T3; desfecho; X: sem dados; T: tumor; N: linfonodos; M: metástase; B: sangue; ISCL/ EORTC: International Society of Cutaneous Lymphoma/European Organizations for Research and Treatment of Cancer”

Tabela 3 - Escore de Guitart et al.¹² dos pacientes ao longo dos três tempos de acompanhamento

Código	Idade (t1)	Pontuação (t1)	Escore (t1)	Idade (t2)	Pontuação (t2)	Escore (t2)	Idade (t3)	Pontuação (t3)	Escore (t3)
1	70	2/2/0/0	4	NA	NA	NA	71	NA	NA
2	61	1/1/0/0	2	NA	NA	NA	61	NA	NA
3	62	1/2/1/0	4	NA	NA	NA	66	3/2/2/1+1	9
4	49	3/0/3/1+1	8	53	3/1/3/1+1	9	55	NA	NA
5	61	2/1/2/1+1	7	67	3/2/2/2+1	10	72	NA	NA
6	63	2/2/2/1+1+1	9	66	NA	NA	70	3/3/2/1+2	11
7	24	NA	NA	32	3/2/2/1+1	9	39	NA	NA
8	54	2/1/1/1+1	6	56	2/1/1/1+1	6	67	NA	NA
9	54	3/1/2/1+1	8	55	3/2/2/1+1	10	59	NA	NA
10	53	2/1/1/1	5	54	2/2/2/1+1+1	9	58	NA	NA
11	39	2/1/2/1+1	7	NA	NA	NA	41	NA	NA
12	31	2/1/1/0	4	33	3/2/2/1+2+1	11	40	NA	NA
13	47	1/1/0/0	2	47	NA	NA	54	NA	NA
14	76	1/1/1/1	4	76	NA	NA	83	NA	NA
15	34	1/1/0/0	2	NA	NA	NA	NA	NA	NA
16	43	1/1/0/0	2	NA	NA	NA	NA	NA	NA
17	47	NA	NA	52	3/1/3/1+1+1	10	53	NA	NA
18	60	2/2/2/1+1+1	9	NA	NA	NA	61	NA	NA
19	58	1/1/2/1+1	6	68	NA	NA	73	NA	NA
20	45	3/2/2/1+1+1	10	67	3/2/3/1+1+1	11	68	NA	NA
21	60	3/2/1/1	7	61	3/2/2/1+1	9	64	NA	NA
22	59	3/2/3/1+1	10	NA	NA	NA	NA	NA	NA
23	54	1/1/1/1+1	5	56	NA	NA	56	NA	NA
24	14	3/3/2/1+1	10	14	3/3/2/1+1+1	11	16	NA	NA
25	75	2/2/2/1+1	8	NA	NA	NA	NA	NA	NA
26	82	2/0/2/1+1	6	84	NA	NA	84	NA	NA
27	68	1/1/0/1	3	69	1/1/0/1	3	72	NA	NA
28	52	3/3/3/2	11	53	NA	NA	55	NA	NA
29	59	3/2/2/1+2	10	60	NA	NA	63	NA	NA
30	48	2/2/0/1	5	48	NA	NA	49	NA	NA
31	29	3/2/2/1+1	9	29	NA	NA	32	NA	NA
32	48	1/1/0/1	3	53	2/2/2/1+1+1	9	60	NA	NA

33	60	2/2/2/1+1+1	9	61	2/1/1/1	5	62	NA	NA
34	35	2/1/1/1	5	40	2/2/2/2+1	9	41	NA	NA
35	26	1/1/1/1+1	5	28	2/2/2/1+2	9	33	3/2/3/2+1	11
36	31	NA	NA	52	1/1/1/1	4	62	NA	NA
37	53	1/1/1/0	3	54	2/2/2/1+1	8	55	2/0/0/0	2
38	51	2/1/1/1+1	6	51	2/2/2/1+1+1	9	53	2/2/2/2+1+1	10
39	76	NA	NA	78	3/2/3/1+1	10	78	NA	NA
40	45	NA	NA	45	2/2/1/1+1	7	55	NA	NA
41	60	2/2/1/1	6	NA	NA	NA	NA	NA	NA
42	49	2/1/0/0	3	49	NA	NA	58	NA	NA
43	78	1/1/0/0	2	NA	NA	NA	78	NA	NA
44	29	NA	NA	33	3/3/2/2+1	11	35	NA	NA
45	52	1/1/0/0	2	54	1/1/0/0	2	65	NA	NA
46	85	2/2/2/1+1+1	9	85	2/2/2/1+1+1	9	86	NA	NA
47	74	1/1/0/0	2	NA	NA	NA	75	NA	NA
48	54	2/2/1/1	6	55	NA	NA	55	NA	NA
49	70	1/1/0/0	2	70	1/1/0/0	2	71	1/1/0/0	2
50	64	2/2/0/1+1	6	64	NA	NA	74	NA	NA
51	45	NA	NA	52	3/2/2/1+1	9	52	NA	NA
52	25	2/1/0/0	3	26	2/2/1/1+1	7	NA	NA	NA
53	65	2/2/0/0	4	NA	NA	NA	NA	NA	NA
54	78	1/1/0/0	2	NA	NA	NA	NA	NA	NA
57	75	2/2/2/1+1	8	NA	NA	NA	NA	NA	NA

NOTA: Código: código de identificação do paciente; idade em anos. T1: admissão; T2: tempo intermediário; T3; desfecho; NA: não se aplica (sem dados)

54	5	5	NA	4	3	0	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
57	5	NA	NA	3	4	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA

NOTA: valores do escore de positividade imunohistoquímica expressos em cruces de 1+ a 5+. Cód.: código de identificação do paciente; (1): admissão; (2): tempo intermediário; (3); desfecho; NA: não se aplica (sem dados)

Tabela 5 - Número de macrófagos M2/mm² nos três tempos de acompanhamento e desfecho entre vivo ou morto com evidência de doença

Código	CD163+/CMAF+ (1)	CD163+/CMAF+ (2)	CD163+/CMAF+ (3)	DESFECHO
1	371,0	NA	NA	VCED
2	245,0	NA	NA	VCED
3	NA	NA	450,00	MCED
4	332,0	497,00	NA	MCED
5	216,0	302,00	NA	MCED
6	317,0	NA	470,00	VCED
7	NA	NA	NA	VCED
8	NA	641,00	NA	VCED
9	449,0	258,00	NA	MCED
10	194,0	NA	NA	VCED
11	466,0	NA	NA	VCED
12	389,0	280,00	NA	VCED
13	349,0	NA	NA	VCED
14	351,0	NA	NA	VCED
15	390,0	NA	NA	VCED
16	350,0	NA	NA	VCED
17	NA	322,00	NA	VCED
18	609,0	NA	NA	VCED
19	358,0	NA	NA	MCED
20	NA	348,00	NA	MCED
21	702,0	741,00	NA	VCED
22	NA	NA	NA	VCED
23	NA	NA	NA	VCED
24	333,0	NA	NA	VCED
25	457,0	NA	NA	VCED
26	285,0	NA	NA	MCED

27	196,0	394,00	NA	MCED
28	351,0	NA	NA	MCED
29	369,0	NA	NA	MCED
30	549,0	NA	NA	VCED
31	482,0	NA	NA	MCED
32	NA	242,00	NA	VCED
33	130,0	548,00	NA	VCED
34	NA	831,00	NA	MCED
35	NA	564,00	NA	MCED
36	NA	172,00	NA	VCED
37	NA	NA	NA	VCED
38	NA	NA	264,00	VCED
39	NA	NA	NA	VCED
40	NA	322,00	NA	VCED
41	NA	NA	NA	VCED
42	507,0	NA	NA	MCED
43	208,0	NA	NA	VCED
44	NA	NA	NA	MCED
45	438,0	NA	NA	VCED
46	NA	419,00	NA	VCED
47	470,0	NA	NA	VCED
48	661,0	NA	NA	VCED
49	NA	410,00	NA	VCED
50	275,0	NA	NA	VCED
51	NA	NA	NA	VCED
52	NA	251,00	NA	VCED
53	604,0	NA	NA	VCED
54	421,0	NA	NA	VCED

57	NA	NA	NA	VCED
----	----	----	----	------

NOTA: valores de macrófagos expressos em número por mm². +. Cód.: código de identificação do paciente; (1): admissão; (2): tempo intermediário; (3): desfecho; VCED: vivo com evidência de doença; MCED: morto com evidência de doença; NA: não se aplica (sem dados)

