

**ESTUDO COMPARATIVO DA EXPRESSÃO DAS
PROTEÍNAS REGULADORAS DA APOPTOSE E DA
PROLIFERAÇÃO CELULAR ENTRE AS FORMAS
ESTACIONÁRIAS E RAPIDAMENTE EVOLUTIVAS
DA MICOSE FUNGÓIDE**

ADRIANA PESSOA MENDES ERIS

**Dissertação apresentada à Fundação Antônio
Prudente para obtenção do título de Mestre em
Ciências**

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Prof. Dr. Fernando A. Soares

Co-Orientador: Dr. José Antonio Sanches Jr

São Paulo

2007

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Prudente

Eris, Adriana Pessoa Mendes

Estudo comparativo da expressão das proteínas reguladoras da apoptose e da proliferação celular entre as formas estacionárias e rapidamente evolutivas da micose fungóide / Adriana Pessoa Mendes Eris -- São Paulo, 2007.

89p.

Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração: Oncologia.

Orientador: Fernando Augusto Soares

Descritores: 1. MICOSE FUNGOIDE. 2. PROTEINAS REGULADORAS DE APOPTOSE. 3. PROLIFERAÇÃO CELULAR. 4. ANTÍGENO KI-67. 5. PROTEINAS BCL-2 DE PROTO-ONCOGENE. 6. ANTÍGENO FAS.

DEDICATÓRIA

À minha avó Rosa (*in memorian*), minha tia Fá (*in memorian*)
e aos meus queridos pais. Sem eles, nada disso seria possível.

Ao Teo, pelo amor, apoio e paciência.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr Fernando A. Soares, pela ajuda, orientação e por me acalmar nos momentos mais difíceis.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr José Antonio Sanches Jr, que me acolheu no Ambulatório de Oncologia Cutânea da Divisão de Dermatologia do Hospital das Clínicas de São Paulo e a quem devo meu conhecimento e interesse pelos linfomas cutâneos.

Ao Prof. Dr. Evandro A Rivitti, chefe da Divisão de Dermatologia do Hospital das Clínicas de São Paulo, por permitir minha presença em seu serviço e fornecer o material necessário para a confecção do meu estudo.

Ao Prof. Dr. Cyro Festa Neto, pela amizade, carinho e por me receber no Ambulatório de Oncologia Cutânea da Divisão de Dermatologia do Hospital das Clínicas de São Paulo.

Aos meus pais, pelo amor, apoio e pelo exemplo de ética, dignidade e honestidade que me ajudam a ser uma pessoa melhor.

Ao meu marido Teo, pelo amor, paciência, ajuda e presença constante, fundamentais na minha vida.

Ao corpo docente da Pós-Graduação da Fundação Antonio Prudente pelo excelente trabalho realizado.

Ao Dr Luiz Fernando Lima Reis, Diretor da Pós-Graduação da Fundação Antonio Prudente, pela ética e conhecimento.

À amiga Bianca, pela ajuda e conselhos.

Aos amigos do Departamento de Oncologia Cutânea do Hospital A.C. Camargo, pela ajuda e incentivo.

Aos amigos do Hospital das Clínicas, Helena e Walmar, pela amizade e apoio.

Aos funcionários do Departamento de Oncologia Cutânea do Hospital A.C. Camargo por todo o apoio, carinho e compreensão.

À todos do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital A.C. Camargo pela ajuda e por me acolherem com carinho.

Aos funcionários do Departamento de Anatomia Patológica da Divisão de Dermatologia do Hospital das Clínicas de São Paulo pela ajuda em encontrar e fornecer o material necessário para o meu trabalho.

À Dra. Mirian Nacagami Sotto, por permitir a realização do estudo com o material de seu laboratório.

Aos funcionários do arquivo de blocos e laboratórios do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital A. C. Camargo.

À amiga Inês Nobuko Nishimoto, pelo auxílio na análise estatística dos dados.

À Sueli Nonogaki, funcionária do Centro de Pesquisas do Instituto Ludwig, pela realização das reações imunoistoquímicas com qualidade e precisão.

Aos funcionários do Serviço de Arquivo Médico e Estatístico (SAME) do Hospital A.C. Camargo pela ajuda em encontrar e selecionar os prontuários.

Aos funcionários do Serviço de Arquivo Médico e Estatístico (SAME) do Hospital das Clínicas de São Paulo pela presteza em encontrar e selecionar os prontuários.

Aos funcionários da Biblioteca da Fundação Antonio Prudente, pelo excelente trabalho que realizam auxiliando a todos na busca das informações necessárias.

À Suely Francisco, bibliotecária Chefe, pela ajuda, conhecimento e pela formatação deste trabalho.

À Ana Maria Rodrigues Alves Kuninari, coordenadora da Pós-Graduação da Fundação Antonio Prudente, e Luciana Pitombeira, funcionária da pós-graduação, pela ajuda, paciência e todas as informações que me auxiliaram a finalizar este trabalho.

Aos pacientes, pela confiança e colaboração.

À Professora Emma Eberlein O. F. Lima, pela ajuda final e orientações sobre a língua portuguesa.

RESUMO

Eris APM. **Estudo comparativo da expressão das proteínas reguladoras da apoptose e da proliferação celular entre as formas “estacionárias” e “rapidamente evolutivas” da micose fungóide.** São Paulo; 2007. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antonio Prudente]

Introdução. Os linfomas cutâneos de célula T compreendem dois terços dos linfomas cutâneos. São linfomas não Hodgkin extra-nodais com comportamento clínico classificado como indolente, intermediário e agressivo. A micose fungóide representa a forma mais comum dos linfomas cutâneos de célula T e consiste em neoplasia clonal de linfócitos T CD4+ de memória. Sua forma clássica é caracterizada por lesões tipo *patches*, placas e tumores que se localizam principalmente nas áreas não expostas à luz solar. A maior parte dos portadores de micose fungóide apresenta forma de doença extremamente indolente, permanecendo com lesões não infiltradas e localizadas por longos períodos. Entretanto, observam-se casos rapidamente evolutivos com prognóstico menos favorável. A fim de descobrirmos se estes pacientes apresentam, além da forma de apresentação clínica, diferenças no comportamento biológico do tumor, avaliamos o índice de proliferação celular e apoptose entre os dois grupos, visto que, a proliferação de células neoplásicas na epiderme em associação com as células de Langerhans sugere que o crescimento desse tumor depende da apresentação antigênica crônica e da inibição da apoptose das células tumorais. **Objetivo.** Comparar a expressão das proteínas reguladoras da apoptose e da proliferação celular entre dois grupos de doentes classificados de acordo com a apresentação clínica: “estacionária” ou “rapidamente evolutiva”. **Pacientes e métodos.** Estudo retrospectivo incluindo 32 pacientes acompanhados nos Ambulatórios de Oncologia Cutânea da Divisão de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e do Hospital A.C. Camargo. Os doentes foram divididos em dois grupos, conforme a apresentação cutânea, e denominados portadores de “forma estacionária” e de “forma

rapidamente evolutiva”. Estudou-se, por imunohistoquímica, a expressão das proteínas Ki-67 para avaliação da proliferação celular e as proteínas Bcl-2, Bax, Fas, Fas-L e caspase 3 para avaliação da apoptose. **Resultados.** Os resultados do estudo imunohistoquímico demonstraram que não houve diferença de expressão entre os dois grupos estudados com os anticorpos marcadores de apoptose FAS, FASL, Bcl 2, Bax e caspase 3. A pesquisa da proteína Ki67 demonstrou diferença de expressão estatisticamente significativa entre os grupos estudados. A porcentagem de células com expressão do marcador de proliferação celular foi maior nos pacientes da “forma evolutiva” com média de 35,1% e mediana de 45%, com p-valor de 0,0001. Os pacientes da forma estacionária apresentaram média de 10,0% e mediana de 8,4%. **Conclusões.** A ausência de expressão da caspase 3 em todas as amostras analisadas sugere que a inibição da apoptose é um fenômeno presente em ambas as formas de apresentação da doença. A expressão positiva das proteínas reguladoras da apoptose, FAS, FASL, Bcl-2 e Bax, em ambos os grupos, poderia indicar que o bloqueio da apoptose ocorra através de Bcl-2, caso a proteína Bax, apesar de expressa, encontre-se inativa ou através de outras proteínas relacionadas às vias da apoptose, visto que a via de FAS-FASL apresentou-se intacta em nosso estudo. O aumento da expressão da proteína Ki-67 nas formas evolutivas da doença poderia ser consequência do desequilíbrio precoce do sistema imune anti-tumoral nesses pacientes.

SUMMARY

Eris APM. [Comparative study of the expression of apoptosis-regulating proteins and cell proliferation between the "stationary" and the "rapidly progressing" forms of mycosis fungoides]. São Paulo; 2007. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antonio Prudente].

Introduction. T-cell cutaneous lymphomas account for two thirds of the cutaneous lymphomas. These are non-Hodgkin extra-nodal lymphomas with clinical behavior classified as intermediate quiescent and aggressive. Mycosis Fungoides represents the most common form of T-cell cutaneous lymphomas and consists of clonal neoplasia of T CD+4 memory lymphocytes. Its classic form is characterized by patches, plaques and tumor type lesions normally located in areas not exposed to sunlight. Most persons suffering from mycosis fungoides present an extremely quiescent form of the disease with non-infiltrated lesions during long periods of time. Nevertheless, rapidly progressing cases can be observed with less favorable prognosis. Proliferation of neoplastic cells on the epidermis in association with Langerhans cells suggests that growth of this tumor is stimulated by the antigen presentation mediated by these cells and reinforces the idea that the major etiopathogenic mechanisms involved in this disease are the chronic antigen stimulation and inhibition of apoptosis of the tumor cells. **Objective.** Compare the expression of apoptosis-regulating proteins and cell proliferation between two groups of patients classified according to the clinical presentation: "stationary" or "rapidly progressing". **Patients and methods.** This is a retrospective study including 32 patients attended by the Ambulatory of Cutaneous Oncology of the Dermatology Division of General Hospital of the São Paulo University Medical School, and the Hospital A.C. Camargo. Patients were subdivided into two groups based on their cutaneous presentation and classified as bearers of a "stationary form" or a "rapidly progressing form" of the disease. Expression of the Ki67 proteins were studied by means of immunohistochemistry in order to evaluate cell proliferation and proteins Bcl-2, Bax, Fas, Fas-L and caspase 3 to evaluate apoptosis. **Results.** The results of

the immunohistochemical study demonstrated no difference in the expressions between the two groups with the antibodies marked for apoptosis FAS, FASL, Bcl 2, Bax and caspase 3. Study of the expression of the Ki67 protein demonstrated a statistically significant difference in the expression between the groups studied. The percentage of the expression was greater in patients with the "progressing form" of the disease. **Conclusions.** The negative expression for caspase 3 in all samples analyzed suggests that the inhibition of apoptosis is a phenomenon present in both the stationary and the rapidly progressing form of the disease. The positive expression of the apoptosis-regulating proteins FAS, FASL, Bcl-2 and Bax, in both groups can indicate that blocking of apoptosis occurs through the Bcl-2, if the Bax protein, despite being expressed, is found inactive or through other proteins related to the apoptosis pathway, since the FAS-FASL pathway appeared intact in our study. The increase in the expression of the Ki67 protein in the progressing forms of the disease may result from the precocious deficiency of the tumoral immune system in these patients.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estágios de maturação dos linfócitos T e a expressão dos marcadores de superfície.	5
Figura 2	Os mecanismos de iniciação, expressão e inibição da resposta imune cutânea.	11
Figura 3	Micose fungóide, neoplasia de células T cutâneas.	17
Figura 4	Conseqüências da produção de citocinas pela célula T maligna.	19
Figura 5	Esquema de progressão da micose fungóide.	23
Figura 6	Vias de apoptose dos linfócitos T ativados.	31
Figura 7	Demonstração de lesões tipo patches e placas em pacientes com micose fungóide.	42
Figura 8	Demonstração de lesões tumorais em paciente com micose fungóide.	43
Figura 9	Fotomicrografia de corte histológico de micose fungóide com marcação positiva para Ki-67.	51
Figura 10	Fotomicrografia de corte histológico de micose fungóide com marcação das células positivas pelo Ki-67 em vermelho.	51
Figura 11	Expressão citoplasmática de FAS.	56
Figura 12	Expressão citoplasmática de FASL.	56
Figura 13	Expressão citoplasmática de Bcl-2.	57
Figura 14	Expressão citoplasmática de Bax.	57
Figura 15	Expressão nuclear e citoplasmática da caspase 3.	58
Figura 16	Expressão nuclear de Ki67.	60
Figura 17	Inibição da via de morte celular por ativação através de c-FLIP.	65
Figura 18	Células de Langerhans na tolerância e no câncer.	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Relação entre alguns antígenos CD, células e funções.	7
Tabela 2	Relação entre determinantes celulares-CD e sub-populações de células identificadas.	8
Tabela 3	Distribuição da casuística de acordo com as variáveis demográficas e clínicas.	44
Tabela 4	Tabela de anticorpos utilizados.	46
Tabela 5	Distribuição das variáveis clínicas e lesões de acordo com evolução.	53
Tabela 6	Distribuição da marcação de expressão das proteínas reguladoras da apoptose, Fas, FasL, Bcl-2, Bax e caspase 3, de acordo com a forma de evolução dos pacientes.	55
Tabela 7	Medidas relativas ao Ki67 de acordo com evolução.	59

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Classificação dos linfomas cutâneos primários da WHO-EORTC.	14
Quadro 2	Estadiamento TNM para os LCCT.	25
Quadro 3	Estadiamento TNM dos L.C.C.T.	25

LISTA DE ABREVIACOES

AICD	<i>Activation induced cell death</i> (Morte celular por ativação)
AIF	<i>Apoptosis-inducing factor</i> (Fator indutor de apoptose)
APC	Célula apresentadora de antígeno
APAF-1	<i>Apoptotic protease activating factor</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
CASPASE	C ystein a spartate s pecific p rotease
CCL17	Ligante de citocina 17
CCL22	Ligante de citocina 22
CCR4	Receptor de citocina 4
CD	<i>Cluster of Differentiation</i> / Diferenciao Celular
CLA	Antígeno linfocitário cutneo
CTLA-4	Antígeno linfocitário citotxico citoplasmtico 4
c-FLIP	<i>cellular FLICE like inhibitory protein</i>
DAB	<i>3,3' Diaminobenzidine Tetrahydrochloride</i>
DHL	Desidrogenase ltica
DISC	<i>Death inducing signaling complex</i> (complexo de sinalização de indução de morte)
DMSO	Dimetilsulfxido
DNA	cido desoxirribonucleico
EORTC	<i>European Organization for Research and Treatment of Cancer</i>
FADD	Domnio de morte associado a FAS
FASL	Ligante de FAS
FASR	Receptor de FAS
FLICE	<i>FAS-associated death-domain-like IL-1beta-converting enzyme</i>
FLIP	<i>FLICE like inhibitory protein</i>
G1	Gap 1= interfase
G2M	Gap 2/mitose
GM-CSF	fator estimulador de colnias
H2O2	gua oxigenada

HTLV1	<i>Human T Cell Lymphotropic Virus Type I</i>
IL1	interleucina 1
INFγ	Interferon gama
ISCL	<i>International Society for Cutaneous Lymphoma</i>
LCCT	Linfoma cutâneo de células T
LNH	Linfoma não Hodgkin
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i> (Complexo maior de histocompatibilidade)
Linfócito Naive	linfócito T ou B maduro sem encontro anterior com um antígeno
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	Reação de polimerase em cadeia
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
S	Síntese
TCR	Receptor de células T
TGF	Fator de crescimento tumoral
TH1	T helper/auxiliar 1
TH2	T helper/auxiliar 2
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i> (Fator de necrose tumoral)
TNM	<i>Tumor, Lymph nodes and Metastasis</i>
TRAIL	Ligante de indução da apoptose relacionado ao TNF
TREG	Linfócitos T regulatórios
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling
USG	ultra-sonografia
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Linfomas	1
1.1.1	Aspectos gerais	1
1.1.2	Maturação dos linfócitos	2
1.1.3	Linfócitos e marcadores de superfície	5
1.1.4	O Sistema Imune Cutâneo	9
1.2	Linfomas não-Hodgkin cutâneos	12
1.2.1	Linfomas cutâneos de célula T	13
1.2.2	Micose fungóide	14
1.3	Apoptose	26
1.3.1	Definição	26
1.3.2	Vias de apoptose	27
1.3.3	Apoptose nos linfomas cutâneos de células T	32
1.4	O índice de proliferação nos linfomas cutâneos de células T	36
2	OBJETIVOS	39
3	CASUÍSTICA E MÉTODOS	40
3.1	Casuística	40
3.2	Métodos	45
3.2.1	Estudo imunoistoquímico	45
3.2.2	Protocolo de Reações	46
3.2.3	Padronização da leitura	48
3.3	Análise estatística	52
4	RESULTADOS	53
4.1	Variáveis Clínicas e as Formas de Evolução	53
4.2	Estudo Imunoistoquímico	54
4.2.1	Proteínas Reguladoras da Apoptose	54

4.2.2	Proteína Marcadora da Proliferação Celular: Ki-67	59
5	DISCUSSÃO	61
6	CONCLUSÕES	76
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77

ANEXOS

Anexo 1 Ficha de registro de dados

Anexo 2 Distribuição das variáveis clínicas comparando-se as formas de evolução.

Anexo 3 Relação dos principais estudos FAS, Bcl-2, Ki67

Anexo 4 Banco de dados

1 INTRODUÇÃO

1.1 LINFOMAS

1.1.1 Aspectos Gerais

Os linfomas são divididos em dois grandes grupos: os linfomas de Hodgkin e os linfomas não-Hodgkin. O linfoma de Hodgkin é um distúrbio maligno único, geralmente originado nos linfonodos. Caracteriza-se morfológicamente pela presença de células gigantes neoplásicas, chamadas células de *Reed-Sternberg*. Evidências obtidas através da reação em cadeia de polimerase permitiram caracterizar essa neoplasia como uma expansão monoclonal de linfócitos B derivados dos centros germinativos (KUPPERS e al. 1994; MARAFIOTI et al. 1997). Os linfomas não Hodgkin são um grupo heterogêneo de doenças linfoproliferativas que compartilham algumas características clínicas e várias diferenças biológicas (ASTER 2005). Podem ser divididos em dois grupos: os linfomas nodais e os linfomas extra-nodais. Os linfomas não-Hodgkin nodais acometem primariamente os linfonodos e os extra-nodais se manifestam inicialmente em outros sítios. A incidência dos linfomas não Hodgkin (LNH) varia de 10 a 20 casos/100.000 habitantes na maioria dos países do ocidente. Aproximadamente 5% dos LNH apresentam manifestação cutânea. Os linfomas nodais são predominantemente de linfócitos B. Na pele, os linfomas de células T são três vezes mais freqüentes que os linfomas B (GROVES et al. 2000; MULLER et al. 2005; WILLEMZE et al. 2005).

Os linfomas cutâneos de célula T (LCCT) são um grupo de LNH com comportamento clínico e biológico distinto. São definidos pela proliferação clonal de linfócitos T cutâneos malignos sem evidência de doença extra-cutânea no momento do diagnóstico. Apresentam incidência anual, avaliada durante o período de 1973 a 2002, de 6,4 casos por 1.000.000 habitantes. O quadro clínico e o prognóstico desses linfomas são completamente diferentes dos linfomas sistêmicos com acometimento cutâneo secundário. A forma mais comum de LCCT é a micose fungóide, correspondendo a 60% de todos os casos. É uma neoplasia clonal de linfócitos T CD4+ de memória, os quais tendem a se acumular na epiderme ao redor das células de Langerhans (CL), formando os patognômicos microabscessos de *Pautrier* (CRISCIONE e WEINSTOCK 2007).

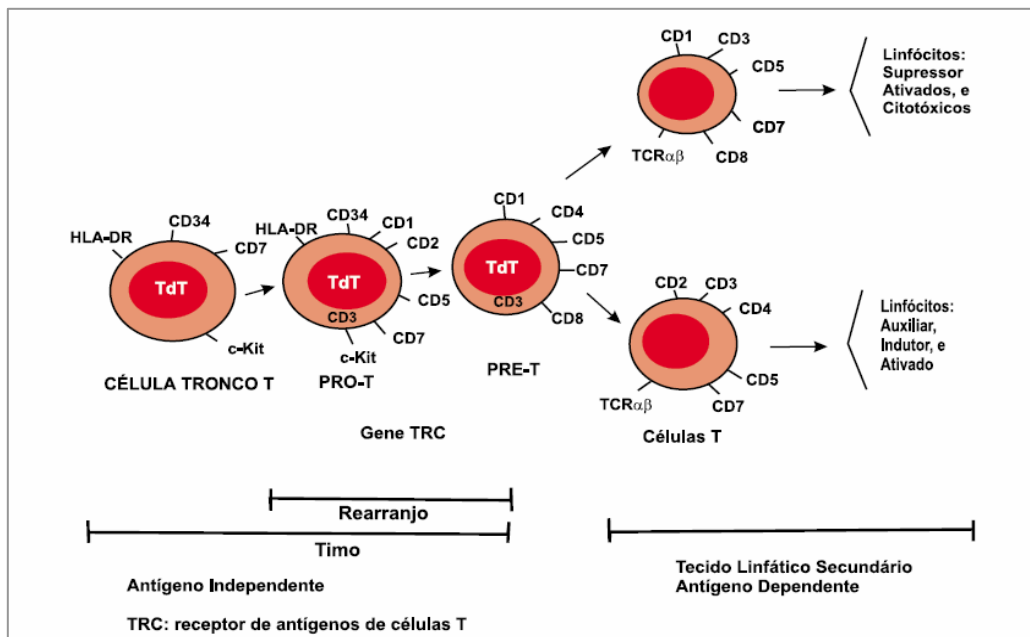
1.1.2 Maturação dos Linfócitos

Os linfócitos são as únicas células humanas que expressam receptores altamente diversificados para o antígeno, permitindo o reconhecimento de uma enorme variedade de substâncias estranhas. Essa diversidade é gerada durante o processo de maturação dos linfócitos T e B a partir de células precursoras. As células precursoras não expressam receptores de antígenos sendo, portanto, incapazes de reconhecer ou responder aos mesmos. A partir do processo de maturação dos linfócitos, os precursores derivados da medula óssea são convertidos em linfócitos maduros. Durante a maturação, um programa altamente regulado de expressão seqüencial de genes leva à proliferação de células em desenvolvimento, promovendo mudança nos fenótipos, aquisição de competência funcional e as várias etapas de seleção que garantirão ao linfócito que migrar para o tecido linfóide

periférico plena competência para responder aos antígenos estranhos, mas não a antígenos próprios. As células-tronco da medula óssea aumentam a produção de todas as células sanguíneas, incluindo as da linhagem linfocítica. A maturação das células B ocorre na medula óssea enquanto que os progenitores das células T migram e completam sua maturação no timo. A maturação inicial das células T e B é caracterizada por uma alta atividade mitótica, estimulada principalmente por interleucina 7, resultando em aumento do número de linfócitos imaturos. Esse processo de maturação envolve a recombinação somática de genes dos receptores de antígenos e a expressão de moléculas de imunoglobulina nos precursores da célula B e de moléculas do receptor de células T (TCR) nos precursores das células T. Os receptores de antígenos das células B e T são codificados por genes formados por recombinação somática e por um número limitado de segmentos gênicos que são segregados. Existem *loci* separados codificando a cadeia pesada da imunoglobulina, a cadeia leve κ da imunoglobulina, a cadeia leve λ , a cadeia β do TCR, as cadeias α e γ e a cadeia δ do TCR (ABBAS e LICHTMAN 2005c).

A maturação das células T no timo evolui em estágios distinguíveis pela expressão dos genes do receptor de antígenos, pelas moléculas de co-receptores CD4 e CD8 e por sua localização no timo. As linhagens de células T iniciais migram para o timo e não expressam TCR nem as moléculas CD4 ou CD8. As células T em desenvolvimento dentro do timo são chamadas de timócitos. Essas células colonizam inicialmente a região mais externa do córtex, onde entram em proliferação, rearranjam os genes do TCR e expressam as moléculas de CD3, TCR, CD8 e CD4 na superfície celular. À medida que os timócitos sofrem o processo de maturação, migram do córtex para a medula do timo. No estágio chamado pró-T, as

células T são CD4⁻ e CD8⁻ (duplo-negativas) e os genes de TCR estão na configuração da linhagem germinativa. No estágio pré-T, os timócitos permanecem duplo-negativos, mas ocorre a recombinação dos genes do TCR, formando-se o pré-TCR. Os pré-TCR são responsáveis pela transdução de sinais que promovem a expressão de CD4 e CD8 e a proliferação de timócitos imaturos. No estágio CD4⁺ e CD8⁺ (duplo-positivo) das células T em desenvolvimento, baixos níveis de TCR são expressos na superfície celular. Os processos de seleção orientam a maturação dos timócitos duplo-positivos, expressando TCR e modelando o repertório de células T pela restrição de MHC próprio e auto-tolerância. Os timócitos TCR $\alpha\beta$ maduros que sobrevivem aos processos de seleção migram para a medula do timo, tornando-se linfócitos CD4⁺ CD8⁻ ou CD8⁺ CD4⁻. Os timócitos da medula adquirem a capacidade de se diferenciar em células efectoras auxiliares ou citotóxicas e, finalmente, deixam o timo e povoam os tecidos linfóides periféricos (ABBAS e LICHTMAN 2005c) (Figura 1).



Legenda: O processo de maturação dos linfócitos T e B consiste numa seqüência de estágios: a maturação inicial envolve a proliferação das linhagens precursoras, a expressão dos genes para o receptor do antígeno e a seleção do repertório de linfócitos maduros.

Fonte: NAOUM (2001)

Figura 1 - Estágios de maturação dos linfócitos T e a expressão dos marcadores de superfície.

1.1.3 Linfócitos e Marcadores de Superfície

Os linfócitos humanos expressam tipos diferentes de proteínas em sua superfície, as quais são detectadas por anticorpos monoclonais. As moléculas na superfície da célula que são reconhecidas por anticorpos monoclonais são chamadas de antígenos ou marcadores, pois identificam e discriminam as diferentes populações celulares. Esses marcadores podem ser agrupados em várias categorias; alguns são específicos para células de uma linhagem em particular ou de uma via de maturação, enquanto a expressão de outros varia de acordo com o estado de ativação ou diferenciação das mesmas células. Adota-se um sistema de

nomenclatura em que um marcador de superfície que identifica uma linhagem em particular ou um estágio de diferenciação é considerado um membro de um grupo (cluster) de diferenciação. Todos os antígenos de superfície dos leucócitos cuja estrutura seja conhecida recebem a designação CD *cluster of differentiation* (ABBAS e LICHTMAN 2005 a e b).

Todas as células possuem, em suas composições estruturais de membranas, proteínas capazes de serem reconhecidas por anticorpos sintetizados em laboratórios: os anticorpos monoclonais e policlonais. Para os anticorpos produzidos em laboratório, as proteínas de membrana de células blásticas, linfócitos, monócitos, entre outras, são identificadas como "antígenos celulares". Observou-se, porém, que grupos de diferentes anticorpos monoclonais reconheciam o mesmo antígeno celular presente em mais de uma célula, quer fossem normais, malignas ou células de linhagens evolutivas. Esses antígenos de diferenciação celular reconhecidos por grupos de anticorpos monoclonais foram denominados por grupo de diferenciação celular ou CD. Foram reconhecidos em experimentação laboratorial perto de 170 diferentes tipos de CD nomeados em algarismos arábicos, que se diferenciam de acordo com a sua descrição e são conhecidos por CD1, CD2, CD3, CD4 e outros (NAOUM 2001). A Tabela 1 mostra a relação entre alguns antígenos CD selecionados com distribuição celular e funções específicas. A tabela 2 mostra a relação entre determinantes celulares CD e sub-populações de células identificadas.

Tabela 1 - Relação entre alguns antígenos CD, células e funções.

Antígeno	CD Células	Funções
CD1 a,b,c,d	Timócitos, células dendríticas Linfócito B (CD1c), células do epitélio intestinal (CD1d)	Molécula semelhante ao MHC- classe 1, especializada na apresentação de antígeno
CD 4	Sub grupo de timócitos, linfócito T auxiliar e inflamatório, monócitos e macrófagos	Co-receptor de moléculas de MHC de classe 2. Receptor para HIV-1 e HIV-2
CD 8	Sub grupo de timócitos, linfócitos T citotóxicos	Co-receptor para MHC de classe 1
CD 9	Linfócito Pré-B, eosinófilos, basófilos e plaquetas	Possível função na agregação e ativação das plaquetas
CD 33	Células mielóides progenitoras e monócitos	Desconhecidas
CD 34	Precursos hematopoiéticos ou células tronco pluripotencial	Ligante para CD 62 L
CD 62 L	Linfócitos B e T, monócitos e NK	Moléculas de adesão de leucócitos. Participa da Interação com endotélio
CD 71	Leucócitos ativados	Receptor de transferrina
CD 166	Atividade leucocitária na adesão de moléculas	Ativação de linfócitos T e B, eosinófilos, fibroblasto cels. timicas e endoteliais, e queratinócitos

Fonte: NAOUM (2001).

Tabela 2 - Relação entre determinantes celulares-CD e subpopulações de células identificadas.

CD	Subpopulações de células identificadas
Linfócito B	
CD 10	Pré-B; Estágio 1 dos timócitos
CD 19	Pré-B; Linfócitos B
CD 20	Maioria dos linfócitos B ; ½ de Pré-B
CD 21	Maioria dos linfócitos B; do sangue, zona do manto e folículo primário
CD 22	Maioria dos linfócitos B; ½ de Pré-B
CD 24	Ativação de antígenos de linfócitos B
CD 38	Linfócitos B
CD 40	Linfócitos B
CD 72	Linfócitos Pan-B
CD 73	Linfócitos B e sub grupos de células T
CD 74	Linfócitos B e macrófagos
CDw 75	Linfócitos B maduros e sub grupos de células T
CD 76	Linfócitos B maduros, sub grupos de células T, e PMNs
CDw 78	Linfócitos Pan-B; macrófagos
Linfócitos T	
CD 1	Linfócitos T, células de Langerhans
CD 2R	Linfócitos T ativados
CD 4	Linfócitos T (auxiliar/indutor)
CD 7	Linfócitos T e timócitos
CD 8	Linfócitos T (citotóxico e supressor)
CD 27	Linfócitos T e plasmócitos
CD 28	Linfócitos T citotóxicos – CD 8
CD 34	Células progenitoras linfóides, centro germinal de Linfócitos B e plasmócitos, linfócitos T proliferantes
CD 45 RA	Linfócitos B, T e NK; monócitos
CD 45 RO	Linfócitos T de memória, células mielóides
Linfócito NK	
CD 2	Linfócitos T e maioria de NK
CD 3	Linfócitos T ativados
CD 7	Maioria de linfócitos T e timócitos
CD 11b	Monócitos e linfócitos T
CD 16	Linfócitos NK, alguns linfócitos T e monócitos
CD 56	Linfócitos NK, alguns linfócitos T
CD 57	Linfócitos NK, alguns linfócitos T

PMN: polimorfonucleares (em especial os neutrófilos)

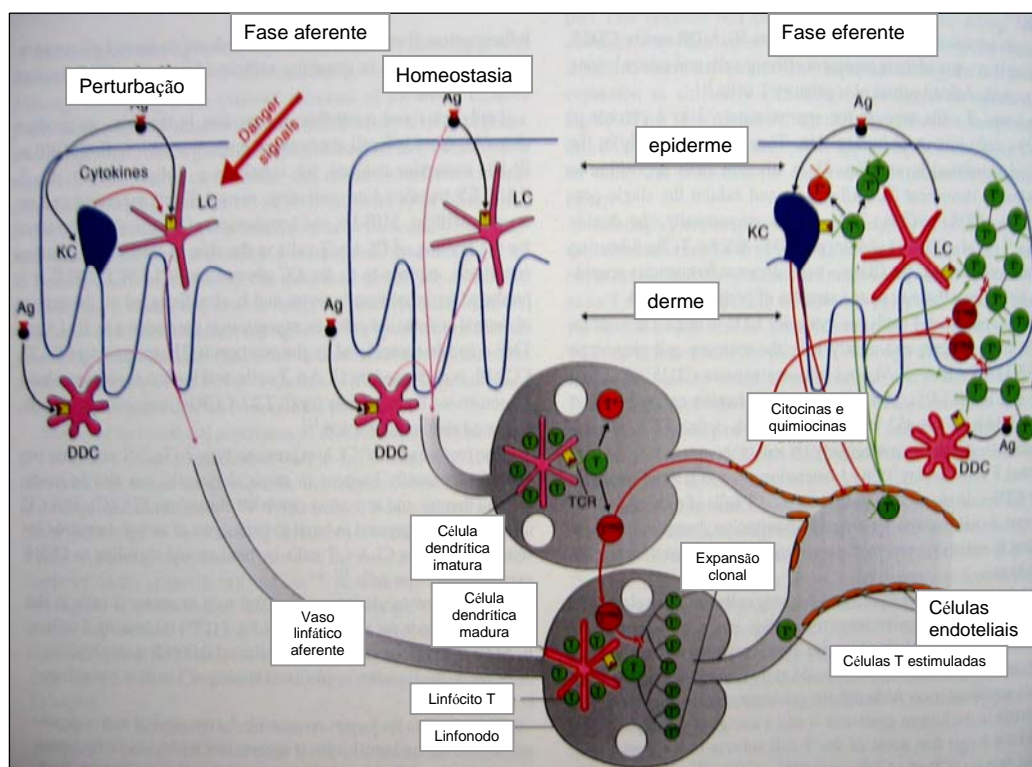
Fonte: NAOUM (2001).

1.1.4 O Sistema Imune Cutâneo

A pele contém sistema imunológico especializado constituído de linfócitos e células apresentadoras de antígenos (APC). É o maior órgão do corpo humano e uma importante barreira física entre um organismo e seu ambiente externo. A pele compõe-se de três grandes camadas de tecidos: uma camada superior – a epiderme; uma camada intermediária – a derme; e uma camada profunda – a hipoderme ou tecido celular subcutâneo. Os principais tipos de células na epiderme são os ceratinócitos, responsáveis pela produção da proteína ceratina e de citocinas; os melanócitos, produtores do pigmento melanina; as células de Langerhans e células T intra-epiteliais. As células de Langerhans, localizadas na porção suprabasal da epiderme, são células dendríticas imaturas do sistema imunológico cutâneo. Essas células formam uma rede que lhes permite capturar os antígenos que entram pela pele. Quando estimuladas por citocinas inflamatórias, perdem adesividade pelas células epidérmicas, migram para a derme e posteriormente para os linfonodos através dos vasos linfáticos. Os linfócitos intra-epidérmicos constituem apenas 2% dos linfócitos associados à pele e a maioria é constituída por linfócitos T CD8+. A derme contém linfócitos T CD4+, CD8+ e macrófagos. Os linfócitos dérmicos compreendem mais de 90% dos linfócitos cutâneos e estão distribuídos em grupos ao redor de vênulas pós-capilares (ABBAS e LICHTMAN 2005a).

As interações moleculares que facilitam a migração das células malignas nos linfomas T cutâneos e sua localização na pele são fundamentais para a fisiologia normal da vigilância imunológica. O reconhecimento de antígenos patógenos através do sistema imune promove a liberação de substâncias como GM-CSF (fator estimulador de colônias), TNF α (fator de necrose tumoral) e IL1(interleucina1)

pelos ceratinócitos e outras células cutâneas. As células dendríticas imaturas na pele (células de Langerhans) capturam o antígeno, processam-no em peptídeos capazes de ligar-se a moléculas do MHC (complexo principal de histocompatibilidade) e o transportam a linfonodos regionais onde o exibirão à linfócitos T ainda não expostos ou células T *naive*. Durante essa migração, as células dendríticas amadurecem e se tornam células apresentadoras de antígenos eficientes. As células dendríticas maduras expressam altos níveis de moléculas de MHC da classe II com peptídeos ligados, bem como co-estimuladores para a ativação de linfócitos T. No linfonodo, os linfócitos T específicos para os complexos peptídeos-MHC exibidos são ativados e inicia-se a resposta imune promovendo a expansão do clone específico. Este linfócito T ativado passa a expressar receptores cutâneos como o antígeno linfocitário cutâneo (CLA) e quimioattractantes como CCR4 (receptor de citocina 4) que facilitam a migração destas células T para a pele, definindo, portanto, a célula T cutânea (STINL et al. 2003; GIRARDI et al. 2004) (Figura 2).



Legenda: a presença de antígeno na pele, por exemplo, um patógeno, gera sinal de perigo que induz à produção de imunidade específica a esse antígeno. Na presença desse sinal, há a secreção de GM-CSF, TNF α e IL1 pelos ceratinócitos. As células apresentadoras de antígeno, CL/CD, capturam o antígeno e o reapresentam como um peptídeo ao complexo MHC. As CD maduras migram para a área para-cortical dos linfonodos e células T *naive* presentes nos linfonodos e são estimuladas passando a expandir-se. Essas células possuem, em sua superfície, o antígeno linfocitário cutâneo bem como receptores de vários quimioatratantes que se ligam às células do endotélio vascular na derme e penetram na pele para proceder a resposta inflamatória. Na ausência de sinal de perigo, as CL/CD migram para o linfonodo e induzem a sensibilização de células T regulatórias (Treg) que limitam a expansão clonal dos linfócitos T, sensibilizados durante a resposta imune primária. Esse evento leva à supressão da resposta imune desejada anti-tumoral e anti-bacteriana e não desejada, a resposta auto-imune. Ag, antígeno; DCC célula dendrítica cutânea; KC ceratinócito; CL célula de Langerhans; T linfócito T *naive*; T' célula T sensibilizada, T* linfócito T anérgico; TCR receptor de célula T; Treg célula T regulatória.

Fonte: STINL et al. (2003).

Figura 2 - Os mecanismos de iniciação, expressão e inibição da resposta imune cutânea.

Na resposta imune cutânea primária, a injúria ou estresse celular estimula os ceratinócitos a liberarem citocinas inflamatórias, as quais recrutam leucócitos para o local da inflamação. Os leucócitos são responsáveis pela iniciação e manutenção da resposta inflamatória. A citocina primária regula as moléculas de adesão nas células endoteliais dérmicas e estimula ceratinócitos basais a liberarem citocinas que penetram na derme, ligam-se à matriz extracelular e recobrem o endotélio luminal. As células T, passando com seus ligantes complementares, irão reconhecer as moléculas de adesão e se ligarão ao longo do endotélio vascular, guiadas, principalmente, pela ligação do antígeno linfocitário cutâneo (CLA) à E-selectina presente no endotélio cutâneo. Esta ligação é fortalecida pelas citocinas ligantes CCL17 (ligante de citocina 17) e CCL22 (ligante de citocina 22) as quais se ligam ao CCR4 (receptor de citocina 4) presente nas células cutâneas (GIRARDI et al. 2004).

1.2 LINFOMAS CUTÂNEOS

Os linfomas cutâneos são um grupo de doenças caracterizado pela presença de linfócitos malignos na pele. São linfomas extra-nodais não-Hodgkin de células T, B e *natural killer* que se apresentam na pele sem evidência de doença extra-cutânea ao diagnóstico (WILLEMZE et al. 2005). Após o trato gastro-intestinal, a pele é o segundo sítio de linfoma não-Hodgkin extra-nodal com incidência anual estimada de um caso para cada 100.000 habitantes (WEINSTOCK 1994; QUERFELD et al. 2003a). Os linfomas cutâneos primários apresentam comportamento clínico e prognóstico diferentes dos linfomas nodais histologicamente semelhantes e que

acometem a pele secundariamente. Dessa forma é fundamental a diferenciação entre linfoma cutâneo primário e secundário à doença sistêmica para o correto estadiamento, tratamento e seguimento desses doentes (DUMMER et al. 2006).

1.2.1 Linfoma Cutâneo de Células T (LCCT)

Os linfomas cutâneos de célula T compreendem dois terços dos linfomas cutâneos. São linfomas não Hodgkin extra-nodais com comportamentos clínicos classificados como indolente, intermediário e agressivo. Esses linfomas representam um grupo heterogêneo de neoplasias originadas de linfócitos T cutâneos que apresentam variações importantes na apresentação clínica, nas características histológicas e imunofenotípicas e no prognóstico. Por muitos anos, a micose fungóide e a Síndrome de Sezary eram os únicos tipos de linfomas cutâneos de célula T conhecidos. Na última década, através da combinação de características clínicas e histológicas com critérios imunofenotípicos, novos tipos de LCCT foram definidos e novas classificações elaboradas (WILLEMZE e MEIJER 2006). A nova classificação utilizada para os linfomas cutâneos foi publicada em 2005 e elaborada a partir de um consenso entre as duas classificações já existentes; a classificação da *World Health Organization* (WHO) e a classificação da *European Organization for Research and Treatment of Cancer* (EORTC). Essa nova classificação divide os linfomas cutâneos em três grupos: os linfomas cutâneos de células T e *natural killer*, os linfomas cutâneos de células B e as neoplasias hematológicas precursoras (WILLEMZE et al. 2005) (Quadro 1).

Quadro 1 - Classificação dos linfomas cutâneos primários da WHO-EORTC.

<u>Classificação dos linfomas primários cutâneos da WHO-EORTC</u>
<u>Linfomas Cutâneos de Células T e NK</u>
Micose fungóide
Micose fungóide – variantes e subtipos:
- Micose fungóide foliculotrópica
- Reticulose Pagetoide
- Cutis Laxa Granulomatosa
Síndrome de Sezary
Linfoma Leucemia de Células T do Adulto
Doenças Linfoproliferativas Primárias Cutâneas CD30+:
- Linfoma Primário Cutâneo Anaplásico de Grandes Células
- Papulose Linfomatoide
Linfoma Subcutâneo de CélulasT- Paniculite Símile
Linfoma Extranodal de células T/NK, tipo nasal
Linfoma Cutâneo Primário Periférico de células T, inespecífico
Linfoma Cutâneo Primário Agressivo Epidermotropico de células T CD8+ (provisório)
Linfoma Cutâneo de células T gama/delta (provisório)
Linfoma Cutâneo Primário de pequena e média célula T CD4+ pleomórfico (provisório)
<u>Linfomas Cutâneos de Células B</u>
Linfoma Cutâneo Primário de Células B da Zona Marginal
Linfoma Cutâneo Primário Centro Folicular
Linfoma Cutâneo Primário Difuso de Grandes Células B, tipo perna
Linfoma Cutâneo Primário Difuso de Grandes Células B, outros
Linfoma de Grandes Células B Intravascular
<u>Neoplasias Hematológicas Precursoras</u>
Neoplasia Hematodérmica CD4+/CD56+ (Linfoma Blástico de células NK)

Fonte: Adaptado de WILLEMZE et al. (2005)

1.2.2 Micose Fungóide

A Aspectos Gerais

A primeira descrição de um paciente com micose fungóide foi feita em 1806 pelo médico francês Jean Louis Alibert. O nome micose fungóide foi decorrente da aparência tipo cogumelo das lesões tumorais da doença. Posteriormente em 1876, Bazin, descreveu pela primeira vez a evolução natural da doença com os estágios de *patches*, placas e tumor.

A micose fungóide é considerada forma indolente e constitui a variante clínica mais comum dos linfomas cutâneos de células T. Sua incidência anual nos Estados Unidos, no período de 1973 a 1992, foi de 0.36 casos por 100.000

habitantes (WEINSTOCK e GARDSTEIN 1999). Estudo prévio demonstrou aumento na incidência da doença durante o período de 1973 a 1984; não houve, porém, aumentos até 1992 (WEINSTOCK e HORM 1988). A taxa de mortalidade avaliada durante o período de 1979-1991 foi de 0,064/100.000 habitantes/ano (WEINSTOCK e GARDSTEIN 1999) e estudo realizado na Suécia encontrou declínio nas taxas de mortalidade entre 1961 e 1990 (SWANBECK et al. 1994). Entretanto, há várias possibilidades de erros nas taxas de mortalidade da micose fungóide, entre elas a não hospitalização para o diagnóstico e tratamento destes doentes prejudicando o registro dos mesmos, a morte desses por outras causas não associadas ao linfoma antes mesmo da progressão da doença e diagnósticos feitos por médicos clínicos fora da área de registro (WEINSTOCK e GARDSTEIN 1999).

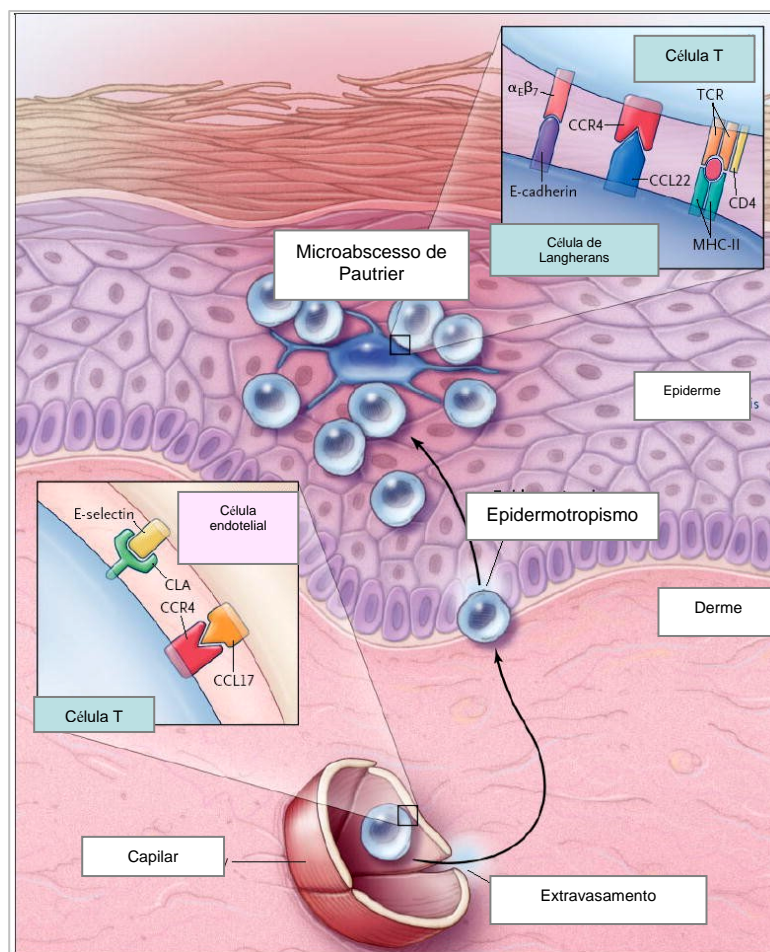
A doença acomete, principalmente, indivíduos adultos do sexo masculino, porém casos esporádicos são descritos em adultos jovens e crianças (AGNARSSON e KADIN 1995; CROWLEY et al. 1998; ALSALEH et al. 2004; FINK-PUCHES et al. 2004). Segundo estatísticas americanas, a incidência é substancialmente maior nos negros em relação aos brancos (WEINSTOCK e GARDSTEIN 1999; CRISCIONE e WEINSTOCK 2007).

A classificação atual WHO-EORTC descreve a micose fungóide como micose fungóide clássica ou de *Alibert-Bazin* e suas três variantes: forma foliculotrópica, reticulose pagetóide e cútis laxa granulomatosa. Essas variantes possuem características clínico-patológicas distintas e, dessa forma, são classificadas separadamente da micose fungóide clássica. No entanto, esse linfoma apresenta outras variantes clínico-patológicas como as formas siringotrópica, granulomatosa, vesicobolhosa, pustulosa, poiquilodérmica localizada,

liquenóide/poiquilodérmica generalizada, hiperpigmentada, hipopigmentada, unilesional, palmo plantar, hiperqueratótica, papilomatosa, ictiosiforme e eritrodérmica, que apresentam comportamento clínico similar à forma clássica da micose fungóide e, portanto, não são classificadas separadamente (LATAKOWSKI e HEALD 2003; WILLEMZE et al. 2005).

B Etiopatogenia

O clone celular maligno, nas lesões cutâneas tipo *patches* ou placas da micose fungóide, apresenta em sua superfície o antígeno linfocitário cutâneo CLA e CCR4+ (PICKER et al. 1990; FUHLBRIGGE et al. 1997; FERENCZI et al. 2002). Dessa forma, as células malignas saem do linfonodo regional e migram em direção à pele guiadas pelo CLA (antígeno linfocitário cutâneo) e CCR4. As células endoteliais expressam E-selectina que se liga ao CLA do linfócito maligno e CCR4 a qual se liga a CCL17 do endotélio vascular, fortalecendo essa ligação e permitindo o extravasamento dos linfócitos malignos para a derme (Figura 3).



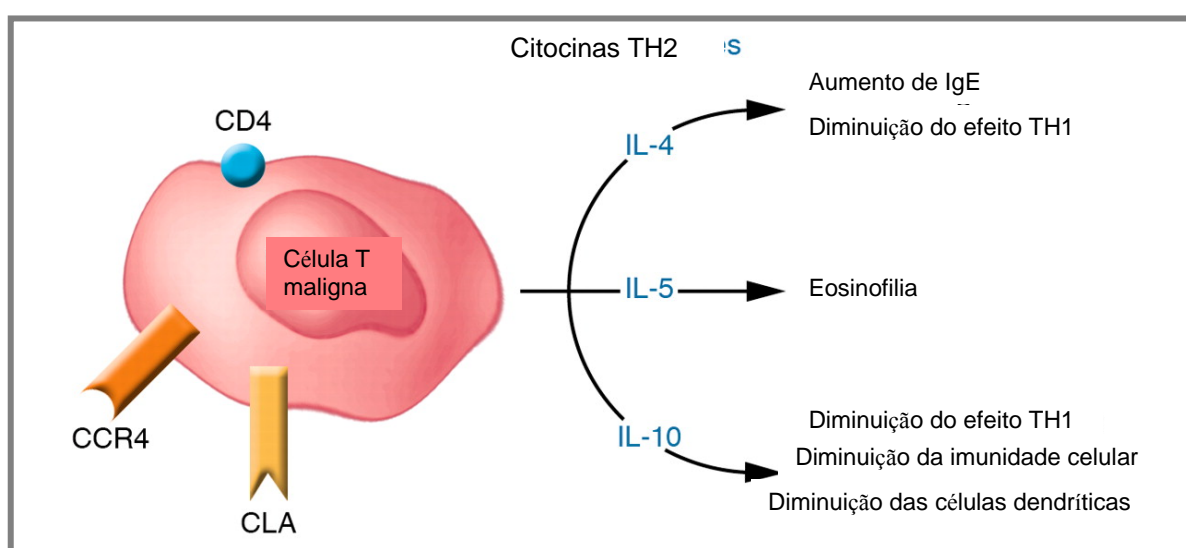
Legenda: ao saírem do linfonodo regional, as células tumorais da micose fungóide expressam CLA e migram em direção à pele atingindo os capilares dérmicos. As células endoteliais expressam E-selectina que se liga ao CLA. Receptores de quimiocinas das células tumorais (CCR4) reconhecem o ligante (CCL17) das células endoteliais e se ligam ao mesmo. Essas ligações permitem que a célula maligna atravesse o endotélio vascular e atinja a derme. As células tumorais apresentam afinidade com as células epidérmicas e, por isso, agrupam-se ao redor das células de Langerhans, formando o microabscesso de *Pautrier*.

Fonte: Adaptado de GIRARDI et al. (2004).

Figura 3 - Micose fungóide, neoplasia de células T cutâneas.

A micose fungóide representa modelo tumoral único, pois tanto as células tumorais como as células reativas são linfócitos. Sua etiologia ainda não está estabelecida e uma das teorias estudadas baseia-se na estimulação crônica dos linfócitos T por um antígeno persistente e a transformação de linfócitos benignos em neoplásicos (DUMMER et al. 1995; BURG et al. 2001). Entretanto, esse antígeno tumoral específico ainda é desconhecido. Alguns estudos tentam demonstrar que as células tumorais apoptóticas processadas e apresentadas pelas células dendríticas poderiam comportar-se como antígenos tumorais (LUFTL et al. 2002). Vários estudos tentaram associar agentes infecciosos virais com o herpes vírus tipo 6 e o *Human T Cell Lymphotropic Virus Type I* (HTLV I) (DIAMANDIDOU et al. 1996), porém estudos recentes não confirmam essa hipótese e consideram-na especulativa (QUERFELD et al. 2003b). Cerca de 30% dos pacientes podem apresentar uma exacerbação do quadro clínico associada à infecção pelo *Staphylococcus aureus* e melhora clínica com uso de antibióticos específicos. No entanto, é questionável se a colonização bacteriana é primária ou secundária à doença (DIAMANDIDOU et al. 1996; QUERFELD et al. 2003b). Estudos demonstram muitas controvérsias da biologia do sistema imune nos linfomas cutâneos de células T em relação aos sistemas TH1 e TH2 (SAED et al. 1994; VOWELS et al. 1994). As células T malignas observadas na maioria dos casos de micose fungóide e Síndrome de Sezary apresentam o fenótipo TH2. Dessa forma, apesar da atividade vigorosa do sistema imunológico do hospedeiro nas fases iniciais da doença com a secreção de interferon- γ pelas células T CD8⁺; a produção crônica de citocinas TH2, como IL4, IL5 e IL10, pela população de células malignas pode ser um dos mecanismos de escape tumoral. Além do aumento da

produção de citocinas TH2, estudos demonstram que a progressão da doença pode desencadear defeito na produção de citocinas TH1. Observou-se declínio na produção de IL12 e INF- α e de células dendríticas. A diminuição dessas células associada ao defeito na produção de IL12 prejudica a produção de outras citocinas como IL15 e IL18, importantes agentes estimuladores do interferon- γ e da resposta TH1 (Figura 4).



Legenda: na micose fungóide e na Síndrome de Sezary, as células T malignas produzem citocinas, IL4, IL5 e IL10 que resultam no predomínio do padrão de resposta TH2 promovendo múltiplas anormalidades na imunidade celular.

Fonte: Adaptado de KIM et al. (2005).

Figura 4 - conseqüências da produção de citocinas pela célula T maligna.

C Micose fungóide forma clássica – características clínicas

A forma clássica da micose fungóide é caracterizada por lesões tipo *patches*, ou seja, máculas eritematosas, hipercrômicas ou hipocrômicas descamativas ou não e não infiltradas, e lesões em placas eritematosas, descamativas e infiltradas, localizadas, principalmente, nas áreas não expostas à luz solar, como dobras

flexurais, axilas e nádegas. Além de lesões tipo *patches* e placas, nas formas mais agressivas ou evolutivas da doença, pode-se constatar a presença de lesões tumorais principalmente na face, dobras flexurais e região inframamária. Os tumores constituem a fase de crescimento vertical da doença e representam pior prognóstico, principalmente, quando se manifestam nos primeiros dois anos após o diagnóstico (DIAMANDIDOU et al. 1998). Classicamente os pacientes apresentam progressão gradual do estágio clínico inicial de *patches* para placas e para tumores, porém um número significativo de doentes não evolui da forma de *patches* e placas para a forma tumoral e permanece nas formas iniciais da doença durante anos (ACKERMAN 1996). Apenas pequena porcentagem de doentes evolui com lesões nodulares e tumorais e porcentagem ainda menor morre em decorrência dos efeitos sistêmicos do linfoma (ACKERMAN 1996).

De fato, a micose fungóide pode iniciar-se em qualquer estágio e variantes clínicas e histopatológicas não habituais coexistem com lesões típicas de placas e *patches* (FUNG et al. 2002). Estudos retrospectivos e multicêntricos realizados demonstram que o risco de progressão da doença correlaciona-se com a severidade das lesões cutâneas iniciais, com a idade do paciente, sendo pior nos idosos, e com a presença de doença extra-cutânea (KIM et al. 2003). Após dez anos do diagnóstico, esse risco no estágio Ia é ao redor de 5 a 10% e nos pacientes com estágio Ib é de 17 a 39%. Nos pacientes com estágios mais avançados da doença, o risco é maior e o intervalo de tempo até a progressão é menor (VAN DOORN et al. 2000).

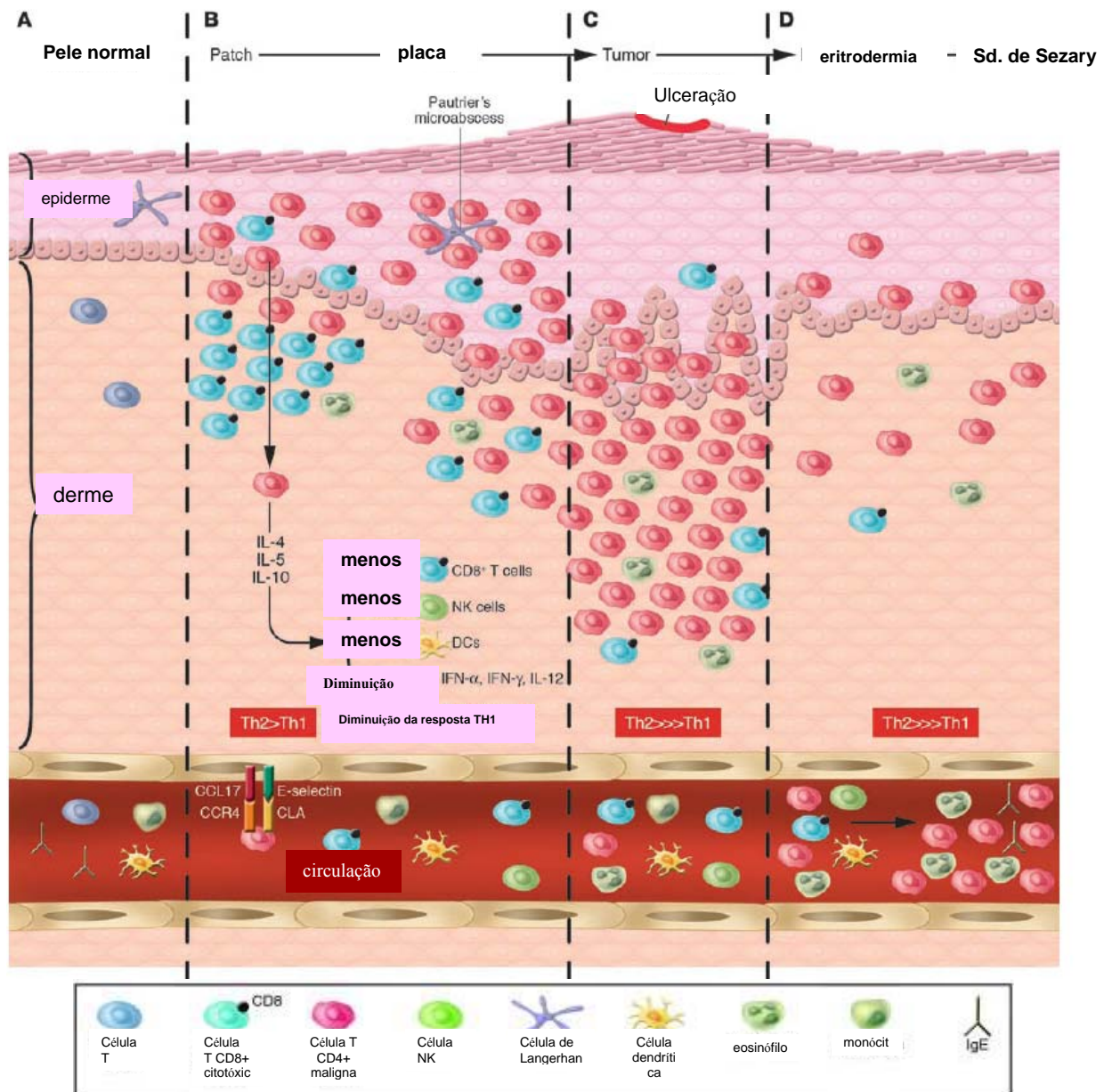
O mecanismo que desencadeia a mudança de comportamento indolente da doença para a forma mais agressiva ainda é obscuro. Estudos tentam explicar esse fato através do sistema imunológico, ou seja, nas formas clínicas iniciais, o sistema

imune anti-tumoral impediria a progressão da doença (LUFTL et al. 2002). O aumento do clone de células malignas estimula a expressão de citocinas TH2, promove o desequilíbrio do sistema imune e permite o crescimento tumoral (KIM et al. 2005). Com a progressão da doença, os pacientes podem evoluir para a variante leucêmica da doença, a Síndrome de Sezary, ou podem transformar-se no linfoma de grandes células.

D Micoze fungóide clássica – características histopatológicas

As características histopatológicas da micoze fungóide variam de acordo com o estágio evolutivo das lesões. Nas lesões cutâneas iniciais do tipo *patches*, o diagnóstico histológico é difícil de ser estabelecido. A lesão patognomônica é o microabscesso de *Pautrier*, mas que é vista em apenas 10% das lesões iniciais. Há presença de infiltrado linfocitário moderado nas porções papilar e subpapilar da derme. O infiltrado é composto principalmente de linfócitos, mas também contém números variáveis de histiócitos. Mesmo na fase inicial da doença, observa-se frequentemente epidermotropismo, aspecto altamente sugestivo de micoze fungóide e que representa a presença na epiderme de células mononucleares geralmente isoladas e rodeadas por um espaço claro ou halo. No estágio de placas, o infiltrado linfocitário é denso, disposto em faixa na derme papilar; o fenômeno do epidermotropismo torna-se mais evidente com a presença de linfócitos agrupados na epiderme ao redor das células de Langerhans, chamados microabscessos de *Pautrier*. A presença de células de *mycosis* que representam linfócitos T com núcleos hipercromáticos, irregularmente configurados, é diagnóstica nessa fase, desde que essas células representem uma porcentagem razoavelmente alta das

células do infiltrado dérmico (LEVER e LEVER 1991). Na fase tumoral, o epidermotropismo torna-se menos intenso, podendo até desaparecer em certos casos e há a infiltração maciça de células mononucleares atípicas na derme reticular com diminuição das células T CD8+ citotóxicas. Na fase eritrodérmica da doença, as células neoplásicas começam a atingir a circulação sanguínea e na síndrome de Sezary há grande quantidade de células neoplásicas circulantes, caracterizando, portanto, a forma leucêmica da doença (SANTUCCI et al. 1994) (Figura 5).



Legenda: A) pele normal, CL na epiderme e linfócitos T cutâneos na derme e no sangue circulante. B) estágio de *patches* e placas, os linfócitos T malignos na epiderme e ao redor das CL formando os microabscessos de Pautrier. C) fase tumoral, células malignas na derme e subcutâneo e diminuição de linfócitos T CD8⁺. D) fase eritrodérmica e SS, células malignas no sangue circulante. Evolução da doença, desvio da resposta imune TH1 para TH2 pelo aumento de citocinas IL4, IL5 e IL10, afetando os linfócitos T CD8⁺, células NK e número de células dendríticas prejudicando a resposta imune do hospedeiro.

Fonte: Adaptado de KIM et al. (2005).

Figura 5 - Esquema de progressão da micose fungóide.

Na micose fungóide, as células apresentam o padrão de células T de memória (CD2+; CD3+; β F1+; CD4+; CD8 -; CD5+; CD45RO+) com freqüente perda do antígeno CD7 e CD26 (ZHANG et al. 2005). Raros casos são descritos com padrão de células T supressoras CD8+/CD4 - (AGNARSSON et al. 1990; BERTI et al. 1999). A demonstração de fenótipos aberrantes com a perda de antígenos pan T, como CD2, CD3 e CD5 pode ser encontrada com freqüência, sendo importante para o diagnóstico (RALFKIAER 1994). As células neoplásicas são CD4+, CLA+ e CCR4+ e produzem citocinas de padrão de resposta TH2, ou seja, interleucinas 4, 5 e 10. Com a evolução da doença, há um desvio da resposta TH1 para resposta TH2. Esses pacientes apresentam eosinofilia e sintomas atopia *like*. A diminuição da resposta TH1 promove maior chance de neoplasias e infecções. A diminuição de células *natural killer* e CD8+ está associada ao comprometimento da resposta imune contra agentes microbianos e tumores (GOLDGEIER et al. 1981; AXELROD et al. 1992; PIELOP et al. 2003; EVANS et al. 2004).

E Estadiamento

O estadiamento clínico dos linfomas cutâneos de células T é baseado no sistema de estadiamento sugerido pelo grupo cooperativo de micose fungóide dos Estados Unidos. Adotou-se o sistema TNM (*Tumor, Lymph nodes and Metastasis*) de BUNN e LAMBERG (1979) modificado, considerando-se o T como lesões cutâneas, o N como linfonodos e o M como lesões viscerais e acrescentando-se o B como sangue periférico. O estadiamento TNMB pode ser visto nos Quadros 2 e 3.

Quadro 2 - Estadiamento TNM para os LCCT.

Estadiamento dos Linfomas Cutâneos de Células T: Classificação TNM
T: pele
T0 lesões clínicas ou histologicamente sugestivas de LCCT.
T1 Placas limitadas, pápulas ou patches < 10% da superfície cutânea.
T2 Placas generalizadas, pápulas ou patches ≥ 10% da superfície cutânea.
T3 Tumor ≥ 1.
T4 Eritrodermia generalizada
N: linfonodos
N0 ausência de linfonodos palpáveis, histologia negativa p/ LCCT.
N1 adenopatia palpável, histologia do linfonodo negativa p/ LCCT.
N2 ausência de linfonodos palpáveis, histologia positiva p/ LCCT.
N3 adenopatia palpável, histologia do linfonodo positiva p/ LCCT.
B: Sangue periférico
B0 células atípicas não presentes < 5%.
B1 células atípicas circulantes > 5%.
M: órgãos viscerais
M0 ausência de envolvimento visceral.
M1 envolvimento visceral com confirmação histológica.

Quadro 3 - Estadiamento TNM dos L.C.C.T.

Estádio clínico	T	N	M
IA	T1	N0	0
IB	T2	N0	0
IIA	T1-2	N1	0
IIB	T3	N0-1	0
III	T4	N0-1	0
IVA	T1-4	N2-3	0
IVB	T1-4	N0-3	1

O prognóstico dos pacientes com micose fungóide está diretamente relacionado ao estágio clínico em que o paciente se encontra, sendo que estudos realizados demonstraram curvas de sobrevida progressivamente piores em função da extensão do acometimento cutâneo, maior número de territórios linfáticos clinicamente acometidos, presença de tumores e eritrodermia. Estudo realizado com 489 pacientes com diagnóstico de micose fungóide demonstrou que pacientes T1, ou seja, com patches e placas em até 10% da superfície corpórea apresentaram sobrevida semelhante à população geral. No entanto, pacientes T2, T3 e T4 apresentaram sobrevida significativamente menor que a população geral. Os pacientes T2 com estágio de placa apresentaram sobrevida pior do que os pacientes T2 com apenas patches. Os autores justificam essa diferença com a profundidade do infiltrado cutâneo e as atipias celulares mais intensas nas lesões tipo placas, quando comparadas com as lesões tipo patches (ZACKHEIM et al. 1999). Devido a essa diferença, os autores destacam a falha no estadiamento do T e sugerem uma revisão desta classificação.

1.3 APOPTOSE

1.3.1 Definição

A apoptose é a forma fisiológica de morte celular inicialmente descrita por KERR et al. em 1972. A célula em apoptose sofre uma condensação seguida de retração, o citoesqueleto é destruído, o envelope nuclear é degradado e o DNA nuclear fragmentado (NICKOLOFF e GRIFFITHS 1990). A indução da apoptose envolve a ativação de enzimas citosólicas chamadas caspases. As caspases

constituem uma família de proteases que apresenta uma cisteína no sítio ativo e cliva suas proteínas-alvo em ácido aspártico específico. As caspases são sintetizadas na célula com um precursor inativo, ou prócaspases, que são normalmente ativadas pela clivagem do ácido aspártico por outras caspases. Ao serem ativadas, as caspases clivam e ativam outras prócaspases, resultando em uma cascata de amplificação proteolítica. A ativação da via de morte intracelular normalmente é desencadeada por um mecanismo de “tudo-ou-nada”. A cascata de proteases não é somente destrutiva e auto-estimulada, mas também irreversível (ALBERTS et al. 2004).

Há três vias distintas iniciadoras das caspases: via de receptor de morte envolvendo a caspase 8, a via de *stress* do retículo endoplasmático atribuída à caspase 12 e a via mitocondrial que ativa a caspase 9. Estudos recentes demonstram evidências, tanto *in vitro* como *in vivo*, que a morte celular programada pode ser desencadeada em circunstâncias diversas e que uma forma de apoptose pode ser produzida sem o envolvimento de caspases – a via de execução autofágica de morte celular. Entretanto, a via de apoptose mediada pelas caspases é ainda a maior ou a mais freqüente via de morte celular programada (ASSUNÇÃO GUIMARÃES e LINDEN 2005).

1.3.2 Vias de Apoptose nos Linfócitos

A Via associada a alterações da permeabilidade mitocondrial (via intrínseca)

Os linfócitos ativados evoluem para a apoptose passiva quando são privados dos sinais de sobrevivência mais frequentemente providos por IL2. Os linfócitos

privados desses estímulos promovem o rápido aumento da permeabilidade das membranas mitocondriais e a liberação do citocromo c que ativará a caspase 9, iniciando a via apoptótica. Essa forma de apoptose é, também, chamada de morte celular programada ou morte por negligência, indicando que muitas células são programadas para morrer. Outros fatores como irradiação causando degradação do DNA, glicocorticóides e certos quimioterápicos podem induzir apoptose nas células alvo pelo mesmo mecanismo mitocondrial e o próprio reconhecimento de um antígeno pode causar translocação mitocondrial de fatores pró-apoptóticos da família Bcl, resultando na morte celular. O controle da apoptose é um complexo fundamental e necessário, pois a morte celular descontrolada é prejudicial para todo o organismo. Os principais mediadores da via intrínseca da apoptose são conhecidos como “família Bcl-2”, a qual é constituída por membros pró-apoptóticos (Bax, Bak, Bad, Bid) e anti apoptóticos (Bcl-2, Bcl-x, Mcl-1). A sobrevivência da célula depende do equilíbrio entre as moléculas promotoras e inibidoras da morte celular. Bcl-2 e Bcl-x promovem a sobrevivência da célula enquanto Bax e Bad promovem a morte celular. Bcl-2 e Bcl-xL inibem a liberação de íons de cálcio, citocromo c da mitocôndria se ligam a APAF-1, inibindo a ativação da caspase 9, impedindo, portanto, uma das vias da apoptose, a morte celular programada ou por negligência.

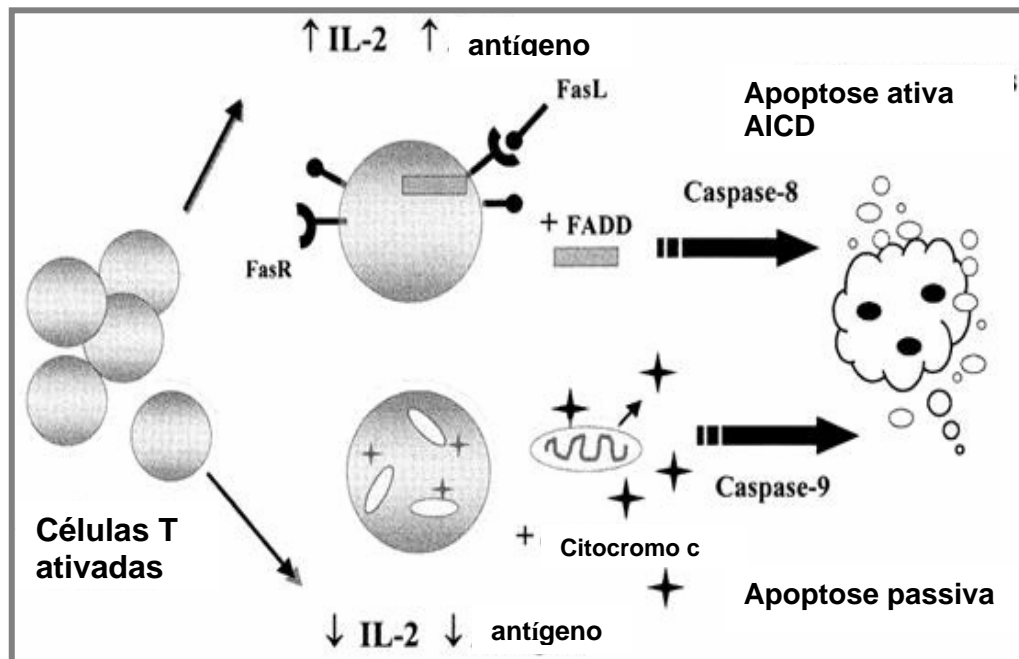
B Via associada a sinais originados dos receptores da membrana plasmática (via extrínseca)

A segunda forma ativa de indução de apoptose é a morte celular induzida por ativação AICD. Essa forma de morte celular ocorre quando os linfócitos T CD4 são ativamente estimulados pelo complexo TCR/CD3. A função primária de AICD é

evitar a auto-imunidade através de um mecanismo falho do próprio e a estimulação crônica de células T ativadas. Essa via de apoptose dos linfócitos é acionada pela ligação de ligantes aos receptores de membrana que induzem à morte, os quais pertencem à família do receptor do fator de necrose tumoral TNF, incluindo um grande número de proteínas como a Fas e o CD40. As regiões citoplasmáticas dos membros dessa família contêm um domínio de morte. Os dois receptores mais bem descritos que contêm os domínios de morte são o Fas e TNF tipo 1. Fas é uma proteína de 36kDa que, na ligação cruzada com anticorpos específicos, aciona a apoptose das células que a expressam. As células linfóides e muitas outras células expressam Fas. O receptor de Fas é expresso em baixos níveis nas células T não estimuladas, mas, com a ligação ao complexo TCR/CD3, esses níveis aumentam (MEECH et al. 2001; ABBAS e LICHTMAN 2005d).

Fas ligante (FasL) é uma proteína transmembrana que também pertence à família do fator de necrose tumoral e é expressa principalmente nos linfócitos T ativados pelo antígeno e pela interleucina 2. Fas e FasL desempenham papel essencial na homeostasia das células T. Quando os linfócitos T maduros são repetidamente estimulados por antígenos, eles co-expressam Fas e FasL. Fas liga-se a FasL na mesma célula ou nas células adjacentes, agregando três moléculas Fas. Os domínios de morte intracelulares aglomerados ligam-se à proteína adaptadora que contém o domínio de morte citosólico chamado FAAD. FAAD liga-se à forma inativa de uma caspase, a caspase 8. A caspase 8 sofre ativação autocatalítica e é capaz de ativar as caspases efetoras e determinar a apoptose. Esta via de apoptose é chamada de via de apoptose induzida por ativação (NAGATA e GOLSTEIN 1995; BOSSI e GRIFFITHS 1999; MEECH et al. 2001; ABBAS e LICHTMAN 2005c).

Defeitos em Fas e FasL são associados com desenvolvimento de síndromes linfoproliferativas-*like* autoimunes. A expressão de FasL requer a ligação ao TCR/CD3 e estímulo de IL2. Altos níveis de IL2 são necessários para inibir a transcrição de c-FLIP, um inibidor da caspase 8. Na ausência de IL2, a via de sinalização de morte via FasL é bloqueada e AICD não ocorre. A IL2 possui papel fundamental na resposta imune, servindo tanto como fator de crescimento para a expansão das células T, como também no restabelecimento da homeostasia pós a resposta imune (MEECH et al. 2001) (Figura 6).



Legenda: A fase terminal da resposta imune requer a ativação tanto da caspase 8 como da caspase 9. Caso persista o estímulo antigênico através do receptor da célula T (TCR/CD3), níveis elevados de IL-2 induzem os linfócitos para apoptose mediada por FAS. A sinalização repetida do TCR/CD3 estimula FasR e FasL na mesma célula. A ligação de FasL a FasR recruta FADD que, em resposta, recruta e ativa a caspase 8. Esta forma de apoptose é chamada de morte celular por ativação (AICD). Com a destruição do antígeno e morte dos linfócitos por AICD, os níveis de IL-2 diminuem bruscamente. A perda do fator de sobrevivência IL-2 promove o início da segunda forma de apoptose que não requer o estímulo da célula T, a forma passiva da apoptose, a qual promove a liberação do citocromo c da mitocôndria que ativa a caspase 9. A maior parte dos linfócitos ativados é eliminada nesta forma de morte celular.

Fonte: Adaptado de MEECH et al. (2001).

Figura 6 – Vias de apoptose dos linfócitos T ativados.

1.3.3 Apoptose nos linfomas cutâneos de células T

Estudos recentes demonstram que o índice de proliferação de linfócitos nos linfomas cutâneos de células T é baixo nas fases iniciais da doença. Desta forma o acúmulo celular seria causado principalmente por defeito da apoptose destas células (DUMMER et al. 1995; DEREURE et al. 2001; ZHANG et al. 2002).

A indução e o controle da apoptose nos linfócitos podem ser mais complexos do que em outras células, pois os linfócitos são as únicas células em animais adultos que podem expandir-se de forma clonal e migrar livremente pelo corpo. Além disso, os linfócitos podem causar um grande dano caso se tornem ativados contra antígenos próprios ou permaneçam na circulação após a resposta imune a um determinado antígeno. Dessa forma, os linfócitos possuem estratégias adicionais para evitar a auto-imunidade e doenças linfoproliferativas. Estas estratégias se utilizam da via de morte de Fas. Durante a resposta imune, linfócitos T específicos ao antígeno são estimulados e expandem em resposta ao antígeno através do complexo receptor de célula T/CD3 em associação com moléculas co-estimulatórias. Essa fase de estimulação é potencializada pela produção de IL-2 e seguida de uma fase de término que resulta na eliminação dos clones expandidos e restabelecimento do número basal de linfócitos. As formas ativas e passivas de apoptose ocorrem nessa fase de término (MEECH et al. 2001). Nos linfócitos, a ativação de uma caspase e a subsequente apoptose poderão ser induzidas por vias distintas: via mitocondrial e via associada aos receptores da membrana plasmática. Moléculas e genes relacionados à regulação da apoptose como Fas, p53, c-myc e Bcl-2 são demonstrados em vários tecidos. Alterações nesses reguladores são descritas em algumas neoplasias hematológicas (DEREURE et al. 2001).

A FAS e FASL

Mutações no gene Fas são encontradas nos linfomas não Hodgkin, leucemia-
linfoma de células T do adulto, leucemia linfoblástica da infância e mieloma
múltiplo, enquanto mutações no gene Bax são encontradas nos linfomas não
Hodgkin (KANAVAROS et al. 1994). Alguns estudos demonstram que os linfócitos
neoplásicos dos linfomas cutâneos de células T apresentam defeito na ativação da
apoptose mediada pela Fas e FasL. Demonstrou-se nesses trabalhos que as células
tumorais apresentam o fenótipo TH2 e produzem pequenas quantidades de IL2,
citocina fundamental para a ativação da apoptose através da via da caspase 8. No
entanto, o conhecimento dos mecanismos de morte celular nos linfomas cutâneos de
células T ainda é pouco conhecido (MEECH et al. 2001). A diminuição da
expressão de Fas foi encontrada no sangue periférico de pacientes com micose
fungóide e síndrome de Sezary (DEREURE et al. 2000) e ausência da expressão de
Fas foi associada a formas agressivas de LCCT (ZOI-TOLI et al. 2000). NI et al. em
2001, demonstraram que as células neoplásicas de lesões cutâneas dos pacientes
com micose fungóide expressam FasL. Nesse estudo observou-se inversão da
distribuição de células neoplásicas FasL+ e linfócitos T CD8+ dentro do infiltrado
das lesões de micose fungóide. Ou seja, nos locais de alta concentração de células
neoplásicas FasL+ havia pequena quantidade de linfócitos T CD8+. Conclui-se que
um dos mecanismos de escape tumoral das células neoplásicas na micose fungóide é
feito através da indução e eliminação de linfócitos T citotóxicos a partir da indução
da apoptose dessas células através da via de FasL-Fas das células tumorais.

B Bcl-2

Em doenças linfo-proliferativas como a micose fungóide e linfoma nodal folicular, a superexpressão da proteína Bcl-2 é descrita como supressora da apoptose, podendo ser um mecanismo importante na patogênese destas doenças (DIAMANDIDOU et al. 1996). Bcl-2 é uma proteína de 25kD que prolonga a vida celular inibindo a apoptose. A expressão desta proteína é estudada em uma variedade de tecidos normais e linfomas, mas há pouca informação sobre a expressão de Bcl-2 em células cutâneas T benignas e malignas (KIKUCHI et al. 1997). Na pele e no epitélio gastrointestinal, as células da camada basal expressam Bcl-2. A expressão de Bcl-2 é encontrada em linfomas malignos de células B, linfomas leucemias de células B, linfoma de Hodgkin e linfomas de células T. KANAVAROS et al. em 1994, realizou estudo com 14 pacientes com forma inicial de micose fungóide, 21 pacientes com micose fungóide na sua forma avançada e 3 pacientes com Síndrome de Sezary e encontrou expressão de Bcl-2 em 70% dos casos. Nos linfomas cutâneos de células T, a expressão de Bcl-2 é encontrada nas células neoplásicas, causando-lhes aumento da sobrevida e promovendo resistência à radioterapia e fotoquimioterapia extra-corpórea (ZHANG et al. 2002). A expressão de Bcl-2 nos linfomas de células T parece refletir o estágio de desenvolvimento correspondente (DUMMER et al. 1995).

C Bax

Bad e Bax são proteínas pró-apoptóticas que bloqueiam o efeito protetor de Bcl-2 e Bcl-xL através da formação de heterodímeros e promovem a apoptose (YANG et al. 1995). A superexpressão de Bcl-2 e Bcl-x, bem como a diminuição de

membros pró-apoptóticos da família Bcl como Bax, Bak, Bik e Bid estão associadas à progressão tumoral (DUMMER et al. 1995). Estudo, realizado em 2003 por ZHANG et al. utilizando linhagem de células de LCCT e biópsias de pele de pacientes com micose fungóide e Síndrome de Sezary, avaliou a expressão de reguladores de apoptose Bcl-x, Mcl-1, Bax e Bad. Nesse estudo, observou-se forte expressão de Bcl-x, Mcl-1, Bad e Bax na linhagem de células do LCCT e nas lesões tipo patches e placas das biópsias de pele de pacientes com micose fungóide. Esses mesmos autores observaram que, com a progressão da doença e com o aumento de linfócitos neoplásicos houve aumento proporcional da expressão de Bax, sugerindo que essa proteína atuaria como um marcador de linfócitos T malignos nos LCCT. No entanto, apesar de fortemente expressos, Bax e Bad apresentavam-se inativos. O trabalho conclui que o aumento da expressão dos inibidores de apoptose (Bcl-x e Mcl-1) e a inativação dos promotores (Bad e Bax) permitem o aumento das células neoplásicas através do aumento da sobrevivência.

D Caspase 3

As caspases são mediadores fundamentais da apoptose. Foram reconhecidas em humanos, até o momento, 14 caspases. A caspase 3 apresenta-se como um componente-chave do mecanismo de apoptose. Essa protease cliva inúmeras proteínas celulares, incluindo PARP (*poly ADP-Ribose polymerase*). A clivagem de PARP é um alvo importante da apoptose de vários agentes anti-tumorais. Estudo realizado por ZHANG et al. em 2005, utilizando inibidor da histona deacetilase (*SAHA suberoylanilide hydroxamic acid*) no tratamento de LCCT, demonstrou ativação da apoptose nas células tumorais através do aumento da concentração de

Bax, da ativação da caspase 3 e da clivagem de PARP. Em 2001, GAD et al. observaram indução da apoptose através do aumento da atividade da caspase 3, após o tratamento de cultura de células de LCCT com terapia fotodinâmica.

1.4 O ÍNDICE DE PROLIFERAÇÃO NOS LINFOMAS CUTÂNEOS DE CÉLULAS T

O comportamento clínico das doenças linfoproliferativas na pele parece ser refletido pelo índice de proliferação e apoptose celular. O índice de proliferação celular pode ser avaliado pela expressão do Ki67. O antígeno Ki67 é um antígeno nuclear humano presente no núcleo de células em ciclo celular (DEREURE et al. 2002). A função do ciclo celular é duplicar exatamente todo o conteúdo do DNA nos cromossomos e, com precisão, segregar as cópias dentro das duas células-filha geneticamente idênticas. A duplicação do DNA ocorre durante a fase S (S de síntese), a qual necessita de 10-12 horas e ocupa em torno da metade do ciclo celular de uma típica célula de mamífero. Após a fase S, a segregação do cromossomo e a divisão celular ocorrem na fase M (M de mitose), que dura em torno de uma hora e envolve uma série de eventos que inicia a divisão celular, ou mitose. Com a continuação da mitose, as células fazem uma breve pausa em um estado denominado metáfase, no qual os cromossomos estão alinhados na região equatorial do fuso mitótico, posicionados para a segregação. A súbita separação das cromátides-irmãs marca o início da anáfase, durante a qual os cromossomos se movem para os pólos opostos do fuso, onde se descondensam e reorganizam núcleos intactos. A célula é então dividida em duas pela divisão citoplasmática, ou

citocinese, e a divisão celular está completa. A maioria das células necessita de muito mais tempo para crescer e duplicar sua massa de proteínas e organelas do que o seu tempo necessário para replicar o seu DNA e dividir-se. Para tal, as fases de intervalos extras são introduzidas em muitos ciclos celulares - uma fase G1, entre a fase M e a fase S, e uma fase G2, entre a fase S e a mitose. Dessa forma, o ciclo celular eucariótico é dividido em quatro fases sequenciais: G1, S, G2 e M. As fases G1, S e G2 consideradas em conjunto são chamadas interfase (ALBERTS et al. 2004).

Ki-67 foi descrito por GERDES et al. (1984) como um anticorpo monoclonal ativo contra antígenos nucleares de células em proliferação do centro germinativo, sendo inicialmente descrito em casos de células de linfoma de Hodgkin e de Reed Sternberg. Trata-se de um complexo protéico biomolecular, não isotônico com 345 e 395kDa, com quase 30.000 pares de bases dentro do genoma humano (SCHLUTER et al. 1993; BROWN e GATTER 2002) presente em todas as fases de proliferação, exceto nas células em repouso (fase G0) (GERDES et al. 1984).

A detecção imunoistoquímica por Ki-67 é um método bem caracterizado no reconhecimento do antígeno nuclear expresso nas fases G1, S e G2M do ciclo celular (TURBITT e MACKIE 1986). Estudo demonstrou uma forte correlação entre o grau histológico dos linfomas não Hodgkin e o índice proliferativo avaliado através do anticorpo Ki-67 e concluiu que esse índice pode ser útil na determinação do diagnóstico e prognóstico de pacientes com doenças linfoproliferativas (HALL et al. 1988).

Em relação aos linfomas cutâneos de células T, estudo comparando o índice proliferativo nas fases iniciais e tumorais da micose fungóide demonstrou pequeno número de células positivas para Ki-67 em todas as fases (TURBITT e MACKIE 1986). DUMMER et al. no entanto, em 1995, estudaram 72 pacientes com micose fungóide, utilizando Bcl- 2 para avaliar o índice de apoptose e Ki-67 para avaliar o índice de proliferação celular. Os resultados do estudo demonstraram expressão significativa de Bcl-2 em todos os estágios da micose fungóide e expressão abundante de Ki-67 nas formas avançadas da doença. A expressão do antígeno Ki-67 igual ou superior a 10% ocorreu em 5% pacientes com lesões tipo *patches*, em 38% dos pacientes com placas moderadas, em 64% dos pacientes com placas infiltradas e em 100% dos pacientes com lesões tumorais. O autor concluiu que, nas lesões iniciais da micose fungóide em que o índice proliferativo é baixo, o acúmulo de células tumorais se dá através do aumento da sobrevivência destas células com a inibição da apoptose por Bcl-2.

2 OBJETIVOS

Pacientes portadores de micose fungóide podem apresentar forma de doença extremamente indolente, com permanência de lesões não infiltradas e localizadas por longos períodos de tempo, ou forma de doença agressiva, rapidamente evolutiva, com prognóstico menos favorável. Esta observação suscita questionamentos relacionados a possíveis diferenças no comportamento biológico da doença. Considerando-se que os linfomas podem resultar de defeitos no mecanismo de apoptose, bem como alteração nas taxas de proliferação celular, elaborou-se esse estudo com o objetivo de avaliar, comparativamente, a expressão de proteínas reguladoras da apoptose e da proliferação celular em dois grupos de pacientes classificados de acordo com a apresentação clínica: estacionária ou rapidamente evolutiva.

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 CASUÍSTICA

Avaliaram-se fragmentos de lesões cutâneas diagnosticadas como linfoma cutâneo epidermotrópico de célula T, micose fungóide, de 32 pacientes acompanhados nos Ambulatórios de Oncologia Cutânea da Divisão de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e do Hospital do Câncer A.C. Camargo.

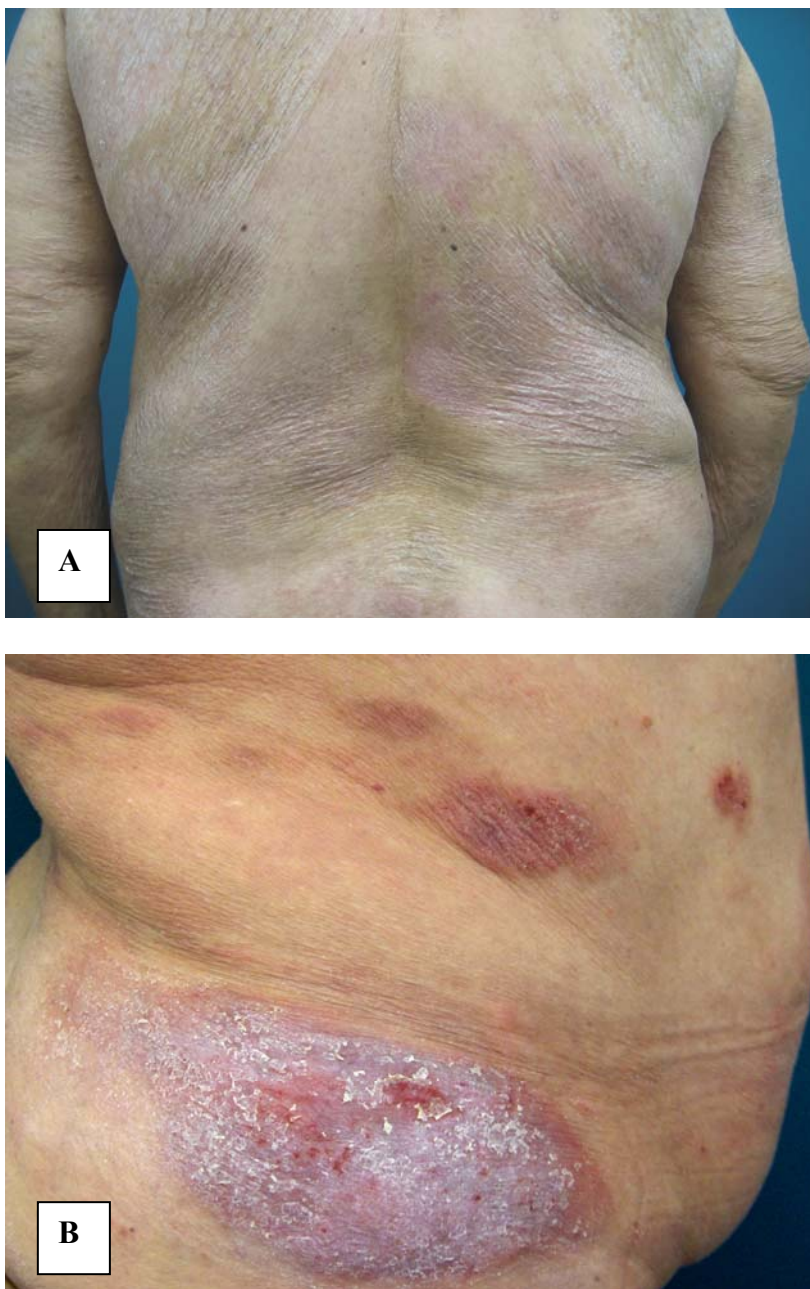
Os doentes foram divididos em dois grupos, conforme a apresentação cutânea, e denominados portadores de forma estacionária e de forma rapidamente evolutiva. Nenhum dos casos apresentava evidência de acometimento linfonodal e/ou visceral na ocasião da inclusão. Todos se encontravam fora de tratamento para a doença por no mínimo trinta dias e apresentavam sorologia negativa para HTLV1/2.

Os critérios utilizados para inclusão dos casos em um dos grupos foram:

- **Forma estacionária (Figura 7).**
 - a. Pacientes com lesões cutâneas não infiltradas, descamativas ou não, hipocrômicas, hiperocrômicas ou eritematosas denominadas *patches*.
 - b. Pacientes cuja forma de apresentação cutânea descrita acima permaneceu inalterada por cinco anos.

- **Forma rapidamente evolutiva (Figura 8).**
 - a. Pacientes com presença de placas infiltradas e/ou tumores desde o início do quadro clínico.
 - b. Pacientes com desenvolvimento de placas e/ou tumores até cinco anos após o diagnóstico de micose fungóide.

Todos os pacientes haviam sido submetidos a exames clínicos, hematológicos, bioquímicos e de imagens, com especial atenção para descrição do tipo de lesão cutânea (*patches*, placas ou tumores), mensuração da superfície corpórea acometida (através da “regra dos nove” utilizada em grandes queimados, (WALLACE 1951) e detecção da presença ou não de linfadenomegalias e/ou visceromegalias (Tabela 3).



Legenda: A) lesões tipo patches acometendo mais de 10% da superfície corpórea; B) lesão tipo placa em abdômen.

Figura 7 - Demonstração de lesões tipo patches e placas em pacientes com micose fungóide.



Legenda: Lesões tumorais na região axilar (A) e mentoniana (B).

Figura 8 - Demonstração de lesões tumorais em paciente com micose fungóide.

Tabela 3 - Distribuição da casuística de acordo com as variáveis demográficas e clínicas.

Variável	Categoria/medidas	Freq	(%) ou medidas
Sexo	Masculino	11	(34,4)
	Feminino	21	(65,6)
Cor	Branca	21	(65,6)
	Não branca	11	(34,4)
Evolução	Forma estacionária	19	(59,4)
	Forma evolutiva	13	(40,6)
Idade ao diagnóstico	N	32	
	Mínima-máxima	19 – 74	
	Mediana	46	
	Média (desvio padrão)	48,7 (16,0)	
Início das lesões (anos)	N	32	
	Min-Máx	3m-34	
	Mediana	3	
	Média (desvio padrão)	7,4 (9,1)	
Lesão inicial	<i>Patches</i>	19	(59,4)
	Placa	7	(21,9)
	Placa & Tumor	6	(18,7)
	Face	11	(34,4)
Localização das lesões	Tronco	29	(90,6)
	Membros	28	(87,5)
	Nádegas	20	(65,5)
Linfonodos palpáveis	Ausente	17	(53,13)
	Presente	15	(46,88)
Superfície corpórea	<10%	9	(28,1)
	>10%	23	(71,9)
Grupo de apresentação	<i>Patches</i> <10%	7	(21,9)
	<i>Patches</i> >10%	12	(37,5)
	<i>Patches</i> e placas <10%	1	(3,2)
	<i>Patches</i> e placas >10%	6	(18,7)
	Tumores	6	(18,7)
Estadiamento	IA	7	(21,9)
	IB	8	(25)
	IIA	11	(34,4)
	IIB	6	(18,7)

3.2 MÉTODOS

Os fragmentos de pele dos 32 pacientes encontravam-se emblocados em parafina e disponíveis nos Departamentos de Anatomia Patológica dos serviços em questão. Todos os exames histopatológicos haviam sido revisados por dois patologistas distintos que confirmaram o diagnóstico de micose fungóide. Inicialmente, foram analisadas 82 lâminas provenientes de biópsias de lesões cutâneas tipo *patches*, placas e tumores. Dentre essas, foram selecionadas 58 lâminas consideradas adequadas para a realização do estudo imunoistoquímico.

3.2.1 Estudo imunoistoquímico

O estudo imunoistoquímico foi realizado nos blocos de parafina das respectivas lâminas selecionadas. Utilizamos o anticorpo Ki67 para avaliar o índice de proliferação celular e os anticorpos Bcl2, Bax, Fas, Fas-L e caspase 3 para avaliar o índice de apoptose (Tabela 4). A metodologia utilizada está descrita a seguir

Tabela 4 - Tabela de anticorpos utilizados.

ANTICORPOS	CLONES	MARCAÇÃO	TÍTULOS	FABRICANTES
BCL2	124	citoplasmática	1:50	Dako, Glostrup, Dinamarca, cod # M0887
BAX	B9	citoplasmática	1:100	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, EUA, cód # sc7480
CASPASE 3	Policlonal de coelho	nuclear e citoplasmática	1:600	Cell Signaling, Technology, Danvers, MA, EUA, cód # 9661
Ki67	MIB-1	Nuclear	1:100	Dako, Glostrup, Dinamarca, cód # M7240
FAS (C20)	Policlonal de coelho	citoplasmática	1:300	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA cód # sc715
FAS-L (N20)	Policlonal de coelho	citoplasmática	1:300	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA cód # sc834

3.2.2 Protocolo de Reações

O material incluído em parafina foi processado de acordo com técnica imunohistoquímica padronizada.

Realizada a desparafinação dos cortes de 3µm de espessura, do material incluído em parafina, em lâminas previamente tratadas com 3-Aminopropyltriethoxy-silano (Sigma, A-3648, EUA), e deixadas por 24 horas em estufa a 60°C. Após a desparafinação, as lâminas foram deixadas nas seguintes soluções nesta ordem:

1. Xilol a 60° por vinte minutos
2. Xilol à temperatura ambiente por vinte minutos
3. Etanol 100% por 30 segundos

4. Etanol 95% por 30 segundos

5. Etanol 70% por 30 segundos

Posteriormente, as lâminas foram lavadas em água corrente e em água destilada. A solução tampão citrato 10mM pH 6.0 foi fervida em panela de pressão (Eterna®, Nigro) destampada e as lâminas foram mergulhadas nela. A panela foi lacrada com a válvula de segurança aberta. Após a saída do vapor saturado, a válvula de segurança foi abaixada e aguardada a pressurização total. Contaram-se quatro minutos após esse sinal. A panela foi deixada fechada sob água corrente por dez minutos, posteriormente foi destampada com as lâminas e deixada por mais dez minutos à temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas em água corrente e destilada. Procedeu-se ao bloqueio da peroxidase endógena com H₂O₂ 3% (água oxigenada 10 volumes) com quatro trocas de cinco minutos cada e as lâminas foram lavadas em água corrente e destilada. Posteriormente, as lâminas foram lavadas em solução salina tamponada com fosfato (*PBS-phosphate buffered saline*) 10mM pH 7,4 por cinco minutos e incubadas com o anticorpo primário diluído em título pré-estabelecido conforme Tabela 4 em tampão PBS contendo albumina bovina (BSA) 1% (Sigma, A9647, EUA) e azida sódica (NaN₃) 0,1% por dezoito horas a 4°C em câmara úmida.

As lâminas foram lavadas em tampão PBS com três trocas de três minutos cada. Incubou-se o anticorpo secundário biotilado-reagente C (*Biotinylated goat anti-mouse/rabbit Ig*) do kit StreptABComplex/HRP Duet (mouse/rabbit) (Dako A/S, K492, Dinamarca) no título pré-estabelecido de 1:200, diluído em PBS, por trinta minutos a 37°C. Posteriormente, foram lavadas em tampão PBS, com três trocas de três minutos cada e incubadas com o complexo – reagente A (Streptavidin)

e reagente B (Biotinylated perixydase) nos títulos pré-estabelecidos de 1:200 diluído em PBS por trinta minutos a 37°C e depois lavadas em tampão PBS com três trocas de três minutos cada. As lamínas foram incubadas em solução substrato: 3,3' Diaminobenzidine Tetrahydrochloride (DAB) 60mg% (Sigma, D-5637, EUA); 1ml de Dimetilsulfóxido (DMSO); 1mL de H202 6% (água oxigenada 20 volumes); 100mL de PBS por cinco minutos a 37°C, ao abrigo da luz.

Observou-se ao microscópio, nas lâminas controles, o desenvolvimento de precipitado castanho dourado como produto final da reação. As lâminas foram lavadas em água corrente e água destilada por três minutos e contracoradas com Hematoxilina de Harris por um minuto. As lâminas foram bem lavadas em água corrente e destilada, imersas duas vezes em água amoniacal (solução de hidróxido de amônio 0,5%) e lavadas em seguida em água corrente e destilada.

As lâminas foram desidratadas nas seguintes soluções:

1. Etanol 80% em 30 segundos
2. Etanol 95% em 30 segundos
3. Etanol 100% duas vezes trinta segundos cada
4. Xilol quatro vezes 30 segundos cada

O procedimento foi finalizado com a montagem das lâminas em Entellan neu (Merck, 1.07961, Alemanha).

3.2.3 Padronização da leitura

A Marcação citoplasmática de Fas e FasL

Os resultados da imunistoquímica para Fas e FasL foram avaliados por dois métodos semi-quantitativos. A intensidade da marcação foi graduada como

negativa (0), fracamente positiva (1), moderadamente positiva (2) ou fortemente positiva (3). Posteriormente, o número de células marcadas foi graduado em (0) para ausência de células positivas, (1) para presença de 1 a 25% de células marcadas, (2) para 26 a 50% de células marcadas, (3) de 50% a 75% de células marcadas e (4) para mais de 75% de células marcadas.

A soma da intensidade e da proporção de células marcadas resultou em dois grupos:

- Fraco com *score* de 0 a 2
- Forte com *score* de 3 a 7

Foram considerados positivos os pacientes com *score* final igual ou superior a 3. Aqueles com *score* final menor que 3 foram considerados negativos.

B Marcação citoplasmática de Bcl2 e Bax

A marcação citoplasmática Bcl2 e Bax foi avaliada qualitativamente e quantitativamente da mesma maneira que Fas e FasL (TORMANEN-NAPANKANGAS et al. 2001).

C Marcação nuclear e citoplasmática da caspase 3

A marcação nuclear e citoplasmática da caspase 3 foi avaliada qualitativamente e quantitativamente como os anticorpos FAS, FASL, Bcl-2 e Bax.

D Marcação nuclear de Ki-67

A quantificação imunistoquímica de Ki-67 foi obtida com a razão paramétrica absoluta entre os núcleos de células positivas e o número total de

células tumorais contadas por seção. O índice de proliferação avaliado pela expressão nuclear da proteína Ki-67 foi definido como a porcentagem de células tumorais com coloração nuclear positiva por, pelo menos, 500 células tumorais contadas por campo de microscopia em aumento de 400x. Foram avaliados cinco campos e consideradas positivas as células que apresentavam núcleos acastanhados.

A contagem foi realizada com o auxílio do programa de computador “Axion Vision” 3.1 (Carl Zeiss Vision, Germany) com o processo de captura de imagens digitais e marcação com cores diferentes as células positivas e as negativas sendo automaticamente processado pelo programa de computador a somatória e a porcentagem de células marcadas para cada categoria, conforme figuras a seguir: (Figuras 9 e 10).

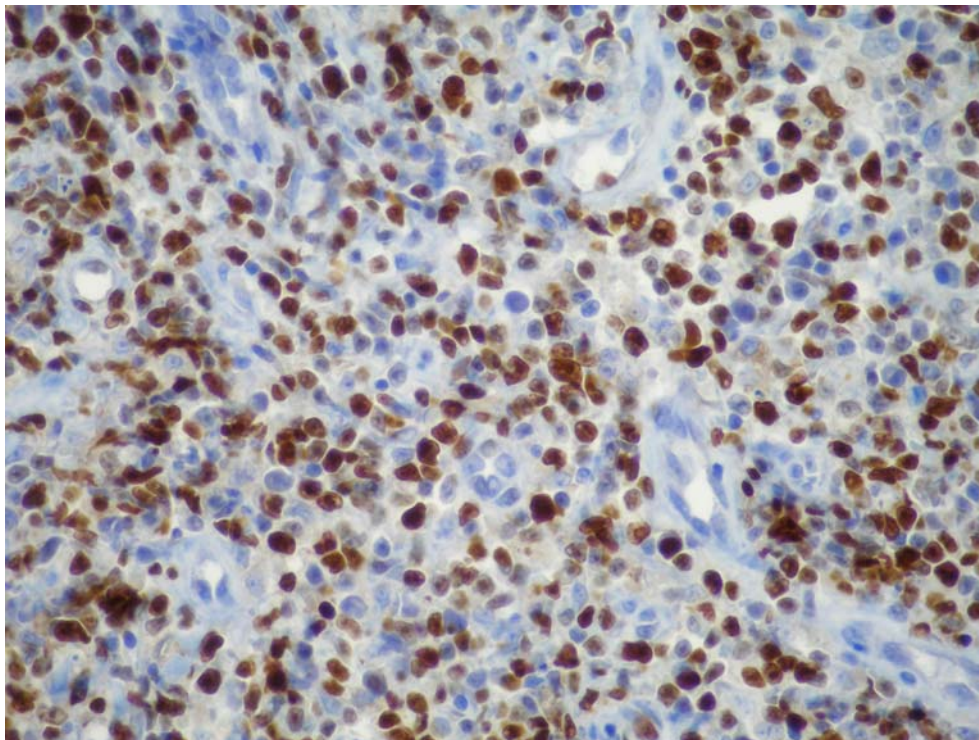


Figura 9 - Fotomicrografia de corte histológico de micose fungóide com marcação positiva para Ki-67 (aumento de 400x).

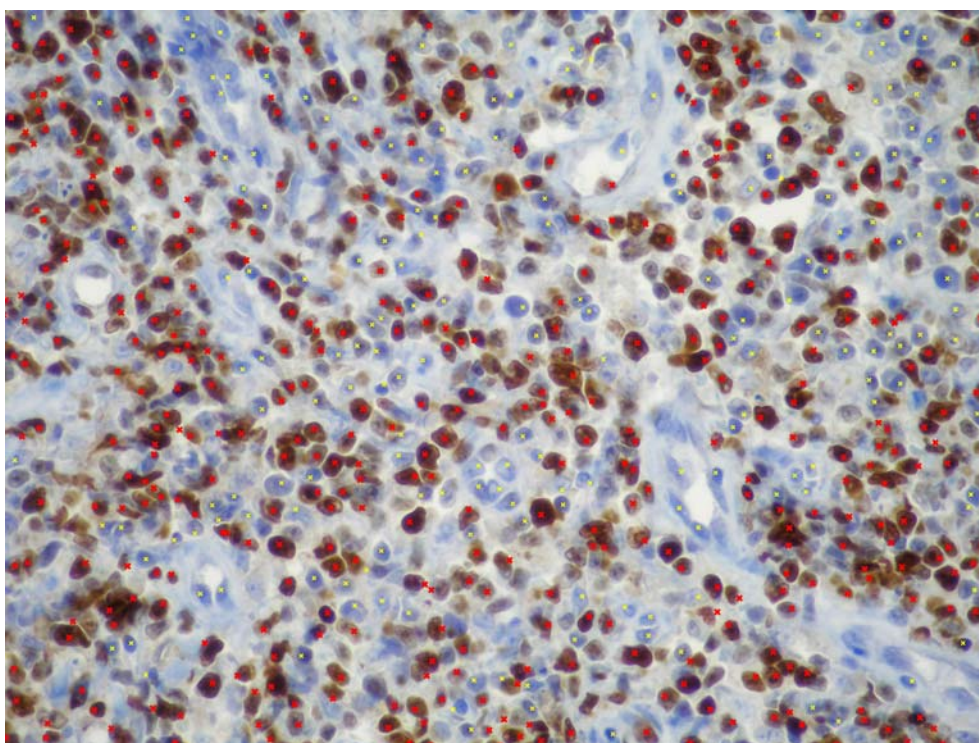


Figura 10 - Fotomicrografia de corte histológico de micose fungóide com marcação das células positivas pelo Ki-67 em vermelho (aumento de 400x).

3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Estatísticas descritivas de distribuição de frequências foram utilizadas para descrever as variáveis categóricas e as medidas de tendência central e de variabilidade para as numéricas.

O teste exato de Fisher foi utilizado para verificar as associações entre as variáveis categóricas e a evolução e o teste não paramétrico U de Mann-Whitney para as numéricas em relação à evolução. O nível de significância de 5% foi adotado para todos os testes estatísticos. O pacote estatístico STATA versão 7.0 foi utilizado para a realização das análises estatísticas.

4 RESULTADOS

4.1 VARIÁVEIS CLÍNICAS E AS FORMAS DE EVOLUÇÃO

A análise estatística das variáveis clínicas de acordo com a forma de apresentação clínica demonstrou diferença estatisticamente significativa apenas em relação ao tempo de aparecimento das lesões cutâneas até a confirmação histológica da doença. No grupo de pacientes com a forma estacionária, esse tempo de aparecimento das lesões variou de 6 meses até 34 anos com uma mediana de 5 anos. No entanto, no grupo de pacientes com a forma rapidamente evolutiva, o período variou de 3 meses a 17 anos com mediana de 1 ano e p-valor estatisticamente significativo de 0,0082 (Tabela 5).

Tabela 5 - Distribuição das variáveis clínicas e lesões de acordo com evolução.

Variável	Medidas / Categoria	Total	Grupos		p-valor
			Estacionária N (%) /medida /medida	Evolutivo N (%)	
Início lesões (anos)	N	32	19	13	0,0082 *
	Min-Max	3 meses-34	6m-34	3m-17	
	Mediana	3	5	1	
	Média (desvio padrão)	7,4 (9,1)	10,4 (10,3)	3,1 (4,7)	

p-valor obtido pelo teste exato de Fisher

* p-valor obtido pelo teste U de Mann-Whitney

dp = desvio padrão

NA = não avaliável

As demais variáveis clínicas analisadas não apresentaram diferenças estatisticamente significantes quando relacionamos a forma de evolução da doença: estacionária ou rapidamente evolutiva (vide Tabelas em Anexo 2).

4.2 ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO

4.2.1 Proteínas Reguladoras da Apoptose

Os resultados do estudo imunoistoquímico demonstraram que não houve diferença de marcação entre os dois grupos estudados com o anticorpos marcadores de apoptose FAS, FASL, Bcl 2, Bax e caspase 3. Todos os pacientes apresentaram marcação forte para FAS. Apenas dois pacientes da forma evolutiva apresentaram marcação negativa para FASL. Em um paciente da forma estacionária, a marcação para Bcl2 não foi avaliável. Um paciente da forma estacionária apresentou marcação negativa para Bax. Em relação à caspase 3, todos os pacientes apresentaram marcação negativa com *score* final menor que 3 (Tabela 6 e Figuras 11 a 15).

Tabela 6 - Distribuição da marcação de expressão das proteínas reguladoras da apoptose, Fas, FasL, Bcl-2, Bax e caspase 3, de acordo com a forma de evolução dos pacientes.

Variável	Categoria	Total	Grupos	
			Estacionária N (%)	Evolutiva N (%)
FAS	Positivo	32 (100,0)	19 (100,0)	13 (100,0)
	Negativo	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
FASL	Positivo	30 (93,8%)	19 (100,0)	11 (84,6,0)
	Negativo	2 (6,2%)	0 (0,0)	2 (15,4)
Bcl-2	Positivo	31 (96,9%)	18(94,7)	13 (100,0)
	Negativo	0 (0,0%)	0 (0,0)	0 (0,0)
	Não avaliável	1 (3,1%)	1(5,3)	0 (0,0)
Bax	Positivo	31(96,8%)	18(94,7)	13 (100,0)
	Negativo	1 (3,1%)	1 (5,3)	0 (0,0)
Caspase 3	Positivo	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
	Negativo	32 (100%)	19 (100,0)	13 (100,0)

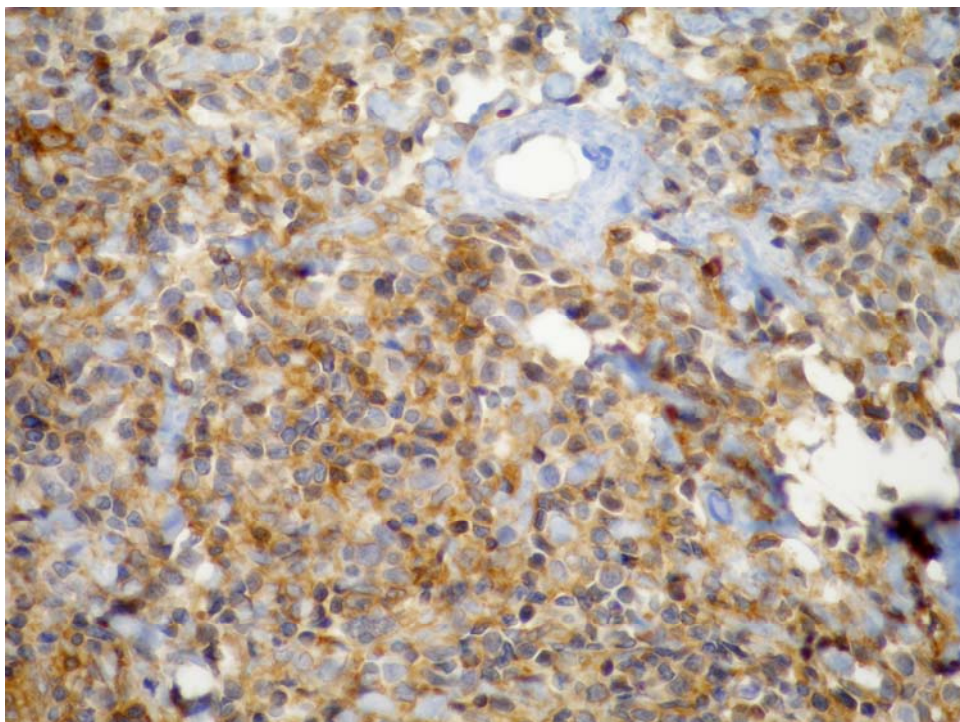


Figura 11 - expressão citoplasmática de FAS aumento original de 400x.

Corte histológico de paciente da forma evolutiva

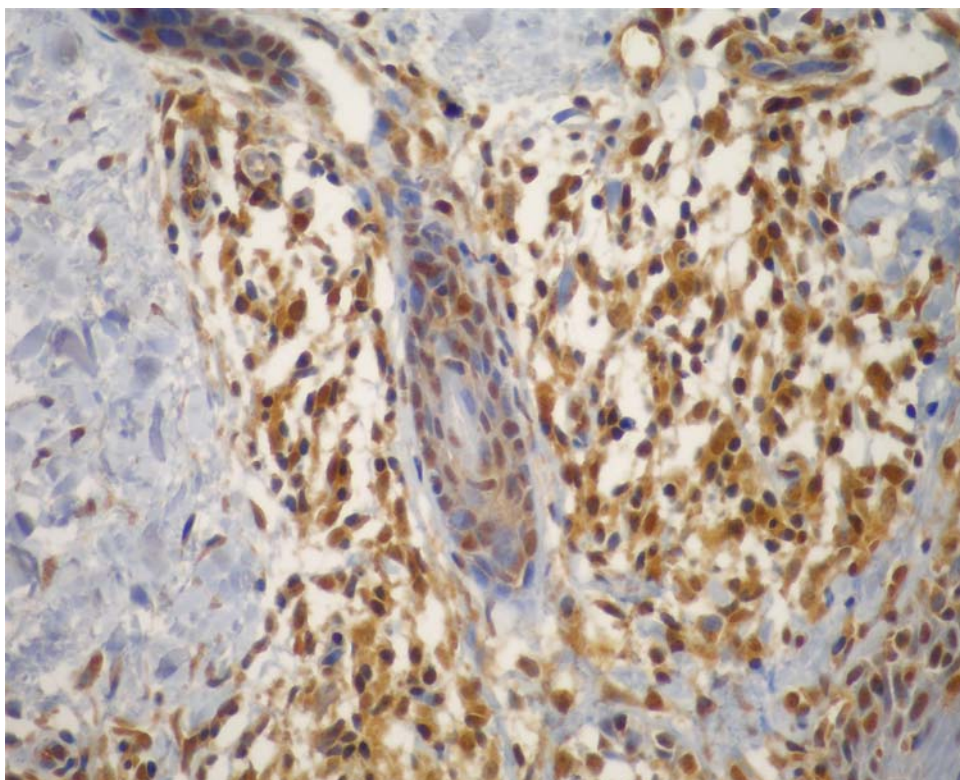


Figura 12 - expressão citoplasmática de FASL aumento original de 400x.

Corte histológico de paciente da forma evolutiva

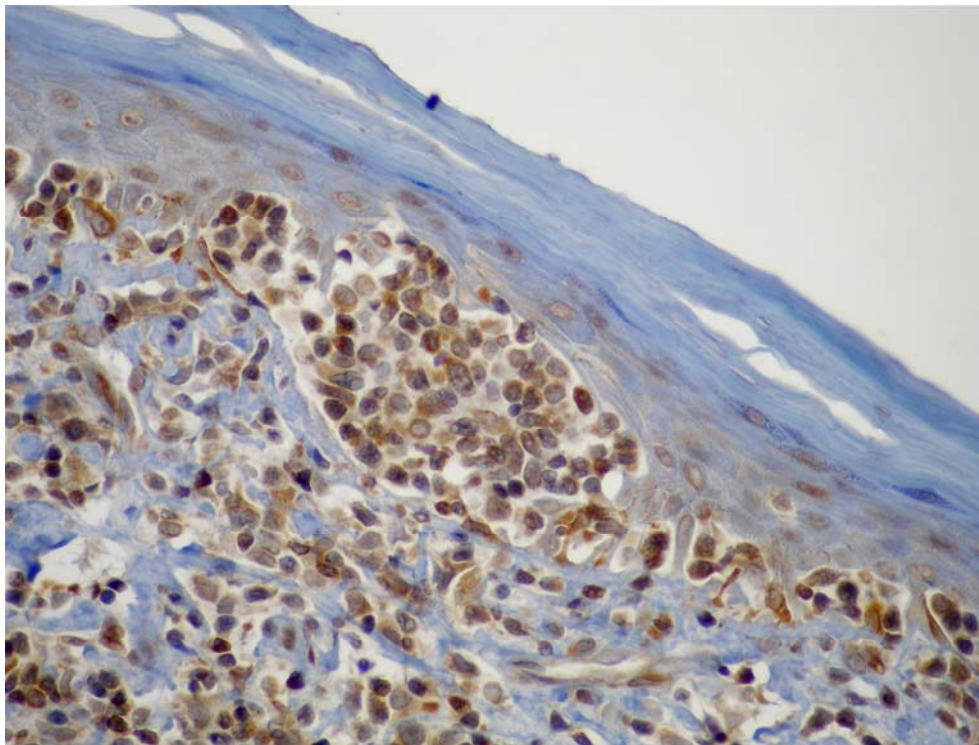


Figura 13 - expressão citoplasmática de Bcl-2 aumento original de 400x.

Corte histológico de paciente da forma evolutiva.

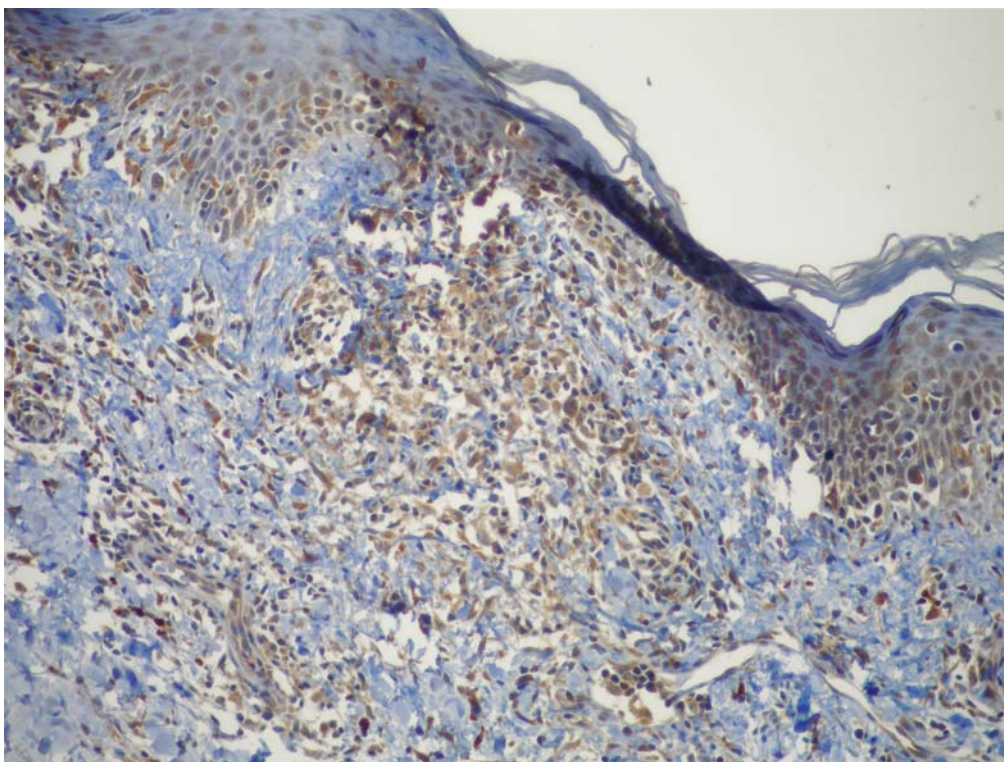


Figura 14 - expressão citoplasmática de Bax em aumento original de 400x.

Corte histológico de paciente da forma evolutiva.

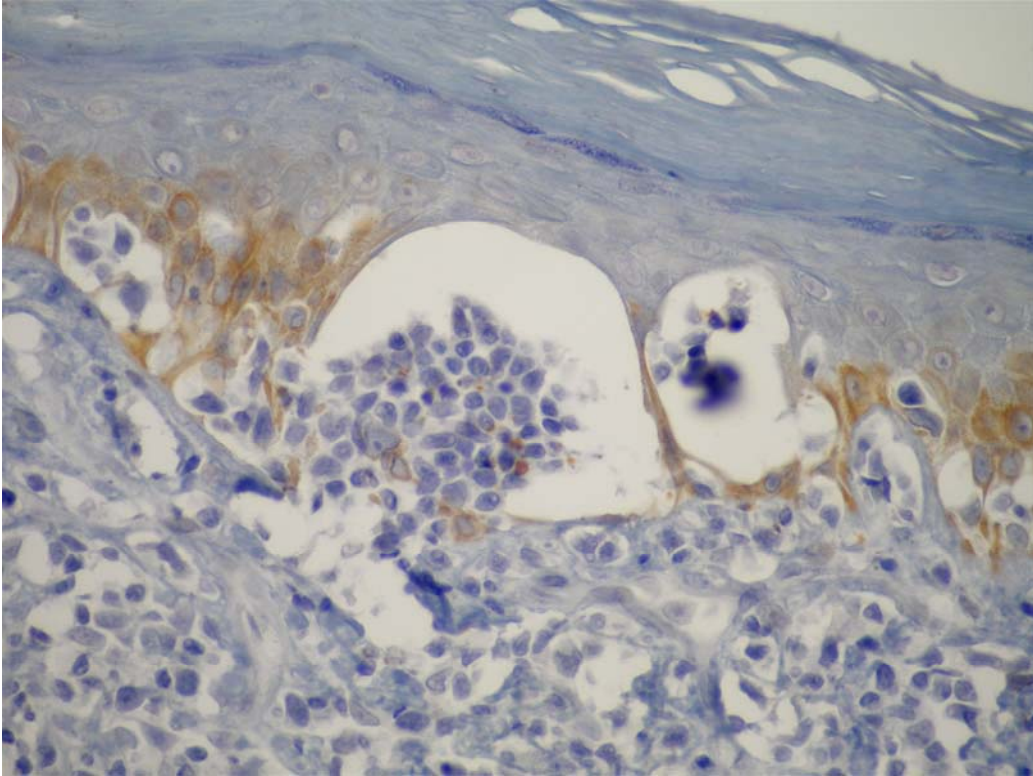


Figura 15 - Expressão nuclear e citoplasmática da caspase 3.

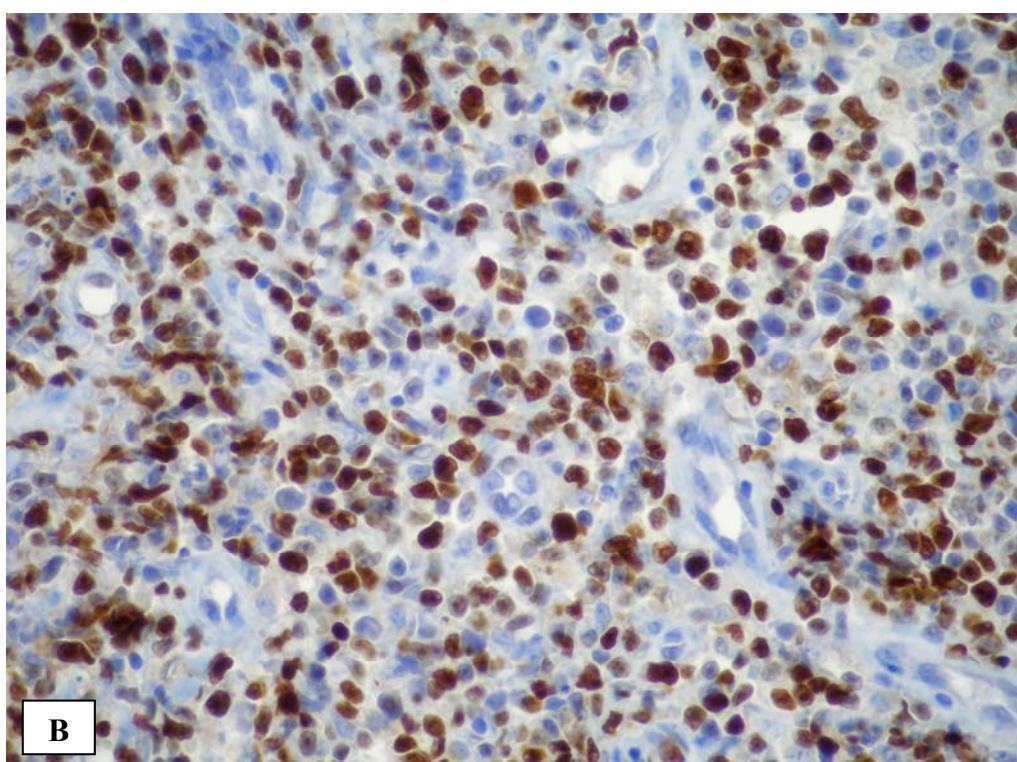
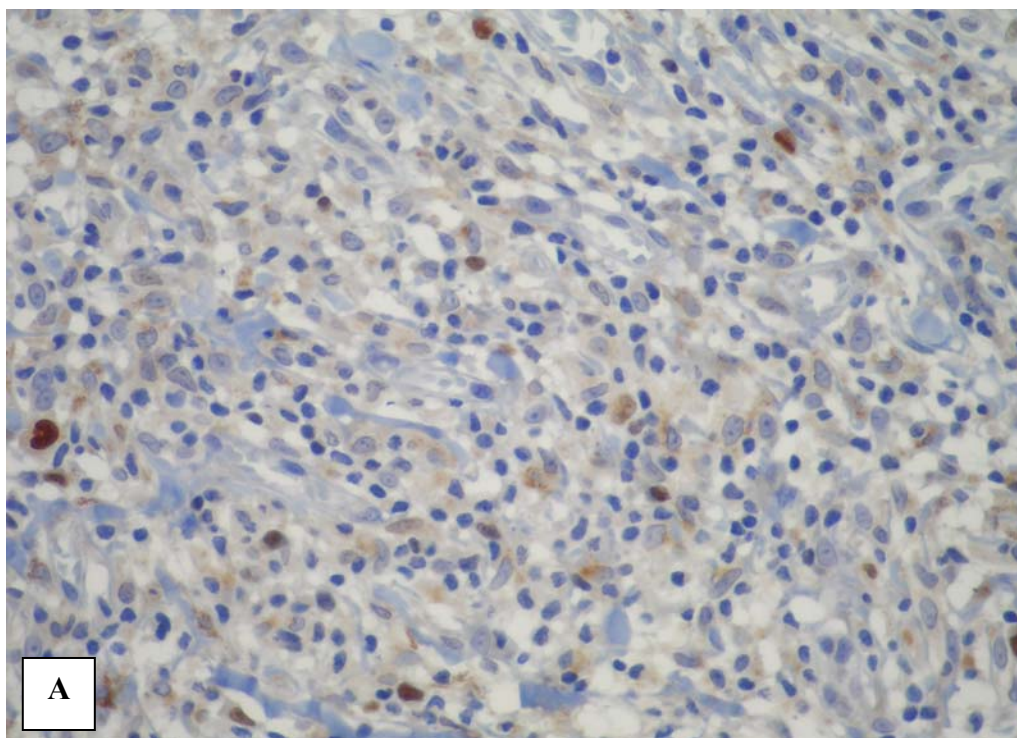
4.2.2 Proteína Marcadora da Proliferação Celular: Ki-67

A pesquisa da expressão da proteína Ki-67, marcador de proliferação celular, demonstrou diferença de expressão estatisticamente significativa entre os grupos estudados (Figura 16). A porcentagem de expressão foi maior nos pacientes da “forma evolutiva” com média de 35,1% e mediana de 45%, com p-valor estatisticamente significativo de 0,0001 (Tabela 7).

Tabela 7 - Medidas relativas ao Ki67 de acordo com evolução.

Variável	Medidas	Total (n=32)	Grupos		p-valor
			Estacionária (n=19) medidas	Evolutiva (n=13) medidas	
KI67	Min-Max	3,7 - 59,8	3,7- 19,8	8,4 - 59,8	0,0001
	Mediana	12,9	8,4	45,0	
	Media (desvio padrão)	20,2 (17,4)	10,0 (4,7)	35,1 (18,6)	

p-valor obtidos pelo teste U de Mann-Whitney



Legenda: A) marcação fraca do anticorpo Ki-67 - paciente com forma estacionária. B) marcação forte do anticorpo Ki-67 - paciente com forma evolutiva da doença.

Figura 16 – Expressão nuclear de Ki-67.

5 DISCUSSÃO

A micose fungóide é considerada classicamente como forma indolente de LCCT. Apesar desse fato constatou-se, no Ambulatório de Oncologia Cutânea da Divisão de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, que determinados pacientes apresentam forma mais agressiva de doença desde o seu início, enquanto outros apresentam doença extremamente indolente e permanecem com lesões cutâneas inalteradas por longos períodos. No intuito de elucidar se esses pacientes apresentam diferenças no comportamento biológico do tumor, avaliaram-se pacientes com diagnóstico clínico e histológico de micose fungóide divididos em dois grupos distintos de acordo com a apresentação das lesões cutâneas iniciais e evolução clínica da doença. Formaram-se dois grupos denominados: forma estacionária e forma rapidamente evolutiva.

A proliferação de células neoplásicas na epiderme em associação com as células de Langerhans sugere que a progressão da micose fungóide seja estimulada pela apresentação antigênica mediada por essas células e reforça a idéia que essa neoplasia consista em uma doença de estimulação antigênica crônica, cujo crescimento é promovido pela apresentação de vírus, bactérias ou peptídeos químicos modificados. Provavelmente, a estimulação antigênica crônica e a inibição da apoptose das células tumorais sejam os principais mecanismos etiopatogênicos envolvidos nessa doença. Entretanto, o mecanismo molecular responsável pela patogênese dos LCCTs ainda não está elucidado.

A apoptose ou morte celular programada é um mecanismo fundamental para o controle da homeostasia celular, que atua como importante ferramenta na defesa contra o câncer. Através da apoptose, células mutadas ou infectadas por vírus, com potencial capacidade de transformação maligna, são eliminadas. Existem duas principais vias de apoptose: a via extrínseca, iniciada através de ligantes de morte e ativação das caspases e a via intrínseca, que depende da liberação de fatores pró-apoptóticos, como o citocromo c, e posterior ativação da caspase 9. Na via intrínseca, a liberação dos fatores pró-apoptóticos é regulada pela família de proteínas de Bcl-2, ou seja, Bcl-2, Bax, Bak e Bid. A família de ligantes da via extrínseca inclui o fator de necrose tumoral (TNF- α), CD95-FAS ligante e ligante de indução da apoptose relacionado ao TNF (TRAIL), que podem ligar-se aos seus respectivos receptores de morte TNF-R1, CD95, TRAIL-R1/DR4 e TRAIL-R2/DR5 ou a receptores decodificados como TRAIL-R3/DcR-1 ou TRAIL-R4/DcR-2. Posteriormente, ocorre a formação do complexo de sinalização de indução de morte (DISC) através da ligação de FADD, ativação da caspase 8, ativação das caspases efetoras, clivagem dos substratos de morte e finalmente a fragmentação do DNA. Paralelamente, os ligantes de morte podem ainda estimular vias de expressão gênica para produção de mediadores inflamatórios e proteínas anti-apoptóticas (RIEDL e SHI 2004; DI PIETRO e ZAULI 2004; ABBAS e LICHTMAN 2005d; LAVRIK et al. 2005).

O controle da apoptose via ligantes e receptores de morte é importante para homeostasia dos linfócitos. Muitos linfócitos precursores são produzidos em excesso e devem ser eliminados. Da mesma forma, na resposta imune após a eliminação do antígeno, o número de linfócitos deve voltar ao normal. Em ambos os

casos, o mecanismo de apoptose utilizado envolve a via de sinalização extrínseca mediada pelo sistema de FAS. A interrupção da via extrínseca da apoptose pode, portanto, corresponder a um importante mecanismo para o desenvolvimento dos linfomas (BRAUN et al. 2007). Em nosso estudo, avaliamos as proteínas reguladoras da apoptose entre os dois grupos estudados e observamos, a partir da não expressão da caspase 3, que o mecanismo da apoptose está supresso em ambas as formas de apresentação clínica. Não obtivemos diferenças de expressão desta protease, componente-chave do mecanismo da apoptose, entre os pacientes da forma estacionária e da forma rapidamente evolutiva. Frente a este resultado, inferimos que a supressão da apoptose é um defeito presente até mesmo nas fases iniciais da doença e que o acúmulo celular seria causado, inicialmente, pela inibição da morte das células neoplásicas e não pela proliferação das mesmas, que, nas fases iniciais, apresenta-se baixo conforme constatado por outros autores (DUMMER et al. 1995; DEREURE et al. 2001; ZHANG et al. 2002).

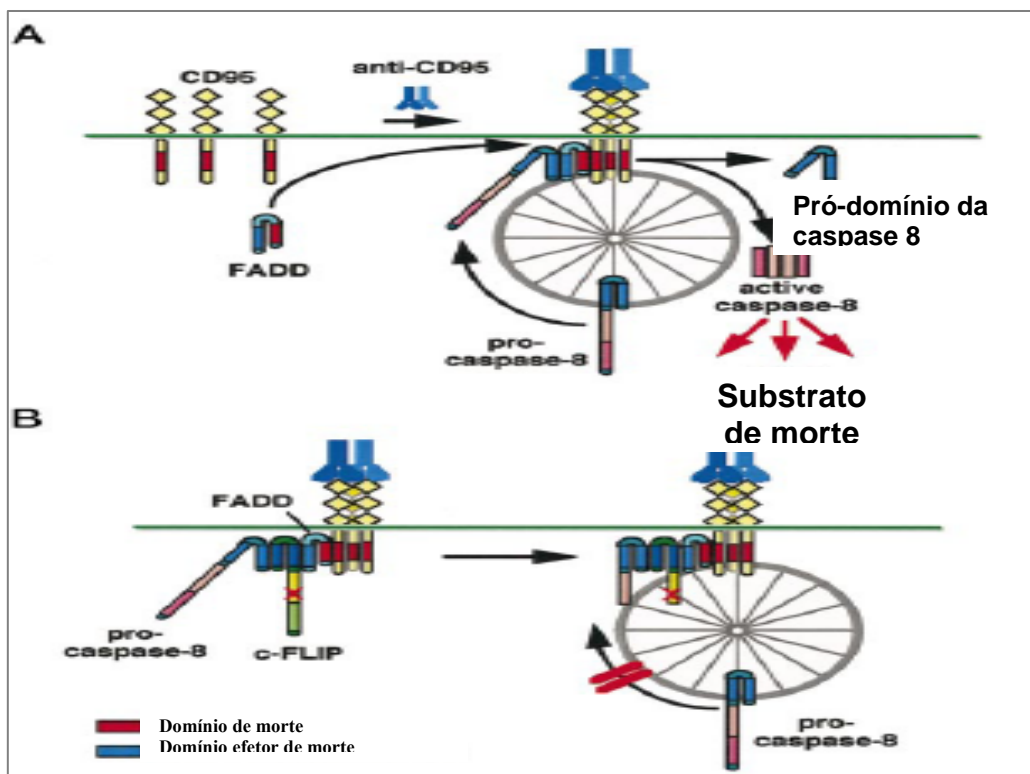
Sabe-se que as células do LCCT são células T maduras ativadas que apresentam a sobrevida média prolongada e, portanto, defeito na morte celular. Um defeito específico na via de FAS-FASL pode resultar no acúmulo dessas células. Na tentativa de descobrirmos se esta via da apoptose estaria inibida e se haveria diferença entre os grupos, estudamos a expressão das proteínas FAS e FASL, mediadoras da via extrínseca, e obtivemos expressão positiva em praticamente todos os casos. Apenas em dois pacientes (15,4%) da forma rapidamente evolutiva houve expressão negativa de FASL.

Nossos resultados foram contraditórios aos resultados de estudos que demonstraram a diminuição da expressão de FAS em linfócito T CD4 do sangue

periférico de pacientes com micose fungóide e síndrome de Sezary e a ausência de expressão de FAS em casos mais agressivos de LCCT. Entretanto, mutações do gene FAS foram encontradas em apenas 14% das células tumorais dos pacientes com LCCT, o que nos leva a concluir que outras anormalidades associadas à sinalização de FAS-FASL devam existir na patogênese da micose fungóide (ZOI-TOLI et al. 2000; MEECH et al. 2001; DEREURE et al. 2002; NI et al. 2005).

Nossos resultados nos levam a pensar na possibilidade de defeito em outra proteína medidora da via extrínseca, visto que a expressão de FAS-FASL apresentou-se presente ou, então, na inatividade destas proteínas, fato que não foi avaliado em nosso estudo.

A morte celular induzida pela ativação mediada por FAS pode ser evitada por uma proteína chamada FLIP (para proteína inibidora FLICE), que possui um domínio de morte, mas não possui um domínio caspase. A FLIP pode ligar-se à proteína adaptadora FADD (domínio de morte associado ao FAS) ou à pró-caspase 8 no citoplasma, sendo porém incapaz de ativá-la. Dessa forma, inibe competitivamente a ligação da caspase 8 ao domínio de morte associado ao FAS (FADD), bloqueando o sinal apoptótico (ABBAS e LICHTMAN 2005d) (Figura 17).



Legenda: A) a ligação de Fas-FasL ativa a caspase 8 e promove a apoptose. B) c-FLIP se liga à FADD e à pró-caspase 8 e bloqueia o sinal apoptótico.

Fonte: Adaptado de SCAFFIDI et al. (1999).

Figura 17 - Inibição da via de morte celular por ativação através de c-FLIP.

Estudo realizado em linhagem de células derivadas de linfoma de Hodgkin demonstrou que células malignas desse linfoma, as células de Reed-Sternberg, expressam c-FLIP e FASL. A expressão de c-FLIP é responsável pela inibição da apoptose via FAS e a expressão de FASL é capaz de induzir a apoptose quando há inibição de c-FLIP. A superexpressão de FAS e c-FLIP foi observada também em linhagem de células de linfoma anaplásico de grandes células. Nesse estudo, a inibição de c-FLIP promoveu a morte celular mediada por FAS. Dessa forma, terapias que bloqueiem c-FLIP podem ser promissoras no tratamento dessas neoplasias (DUTTON et al. 2004; OYARZO et al. 2006).

As células neoplásicas da micose fungóide são CD4+, CLA+ e CCR4+ e produzem citocinas de padrão de resposta TH2, ou seja, interleucinas 4, 5 e 10. Com a evolução da doença, observamos aumento da proliferação celular e, conseqüentemente maior concentração de células malignas e desvio da resposta TH1 para resposta TH2. A produção excessiva de citocinas do tipo TH2 pelas células malignas pode antagonizar a produção de citocinas do tipo TH1, como IL2 e INF- γ . Baixos níveis de IL2 são insuficientes para inibirem FLIP, permitindo que essa proteína bloqueie a via de FAS-FASL e impeça que as células malignas sofram apoptose (MEECH et al. 2001). Esses estudos favorecem a hipótese de que a via de FAS-FAS-L esteja prejudicada nesses pacientes, nas lesões mais agressivas da doença, onde encontramos maior concentração de linfócitos neoplásicos e, portanto aumento das citocinas de padrão de resposta TH2, como as interleucinas 4, 5 e 10 e diminuição das citocinas TH1, como IL2 e IFN γ . Como dito anteriormente, baixas concentrações de IL2 não inibem a atividade de FLIP e permitem a inibição da via extrínseca através da ligação dessa proteína à FADD e inibição da pró-caspase 8. Nossos resultados não demonstraram diminuição de FAS ou FAS-L, mas sugeriram defeito na apoptose em todos os pacientes. Dessa forma, a via extrínseca da apoptose pode estar prejudicada pela inatividade dessas proteínas, apesar da sua presença ou através da inibição dessa via após a ligação de FAS e FAS-L a partir da ligação de FLIP à FADD.

Avaliamos a expressão das proteínas Bcl-2 e Bax, membros da família Bcl, para obtermos informações sobre a via intrínseca de morte celular. A família de proteínas Bcl-2 é constituída por proteínas pró-apoptóticas e anti-apoptóticas. O equilíbrio entre essas proteínas é fundamental para a manutenção da homeostasia

celular através do controle da via intrínseca de morte celular. A superexpressão de proteínas anti-apoptóticas e a diminuição de proteínas pró-apoptóticas estão associadas com a progressão tumoral (DUMMER et al. 1995; KORSMEYER 1995).

A primeira proteína dessa família a ser identificada foi Bcl-2, o segundo oncogene encontrado em um linfoma de células B no homem. Bcl-2 e seu homólogo Bcl-x inibem a apoptose impedindo a liberação mitocondrial do citocromo c e ligando-se a Apaf-1. Estudos avaliando a expressão de Bcl-2 nos LCCT demonstram positividade nas lesões iniciais e avançadas da doença e também na síndrome de Sezary, forma leucêmica e agressiva dos LCCT (DUMMER et al. 1995). Em 1994, KANAVAROS et al. avaliaram a expressão das proteínas c-Myc, Bcl-2, p53 e PCNA em pacientes com micose fungóide nas lesões iniciais tipo patches e nas lesões em placas e tumores e observaram aumento da expressão dessas proteínas nas formas avançadas da doença, evidenciando o aumento da proliferação celular através da expressão de PCNA e inibição da apoptose através de Bcl-2, c-Myc e p53. A baixa positividade para Ki67 e a expressão abundante de Bcl-2 nas formas iniciais da micose fungóide sugerem que o acúmulo de células tumorais durante a fase inicial da doença poderia ser facilitado pelo aumento da sobrevivência da célula neoplásica (DUMMER et al. 1995). Em 2003, RASSIDAKIS et al. avaliaram a taxa de apoptose utilizando a técnica de TUNEL em 112 linfomas de células T, incluindo 10 casos de micose fungóide e correlacionaram os resultados com a expressão de Bcl-2. A taxa média de apoptose foi de 1,47% com variações de acordo com o tipo histológico do tumor, sendo que as menores taxas foram encontradas nos casos de micose fungóide (média de 0,74%), havendo correlação

entre apoptose e positividade para Bcl-2, ou seja, nos casos Bcl-2+ as taxas de apoptose estavam diminuídas. Dois fatores de transcrição foram associados ao aumento de expressão do gene Bcl-2: c-Myb e STAT 5 (FRAMPTON et al. 1996; TAYLOR et al. 1996, WEBER-NORDT et al. 1996; SALOMONI et al. 1997). Estudo utilizando linhagem de células de LCCT sugere que o aumento da proteína Bcl-2 nas células malignas do LCCT pode ser consequência da ação direta de c-Myb e STAT5 ativados pelas interleucinas 7 e 15. Os autores concluem que, nas fases iniciais da doença, c-Myb pode aumentar a expressão de Bcl-2 (QIN et al. 2001).

Em nosso estudo, Bcl-2 apresentou-se fortemente expresso em ambos os grupos estudados. Não obtivemos diferenças de expressão dessa proteína entre as formas estacionárias e rapidamente evolutivas.

Da mesma forma, a expressão da proteína Bax apresentou-se forte em todos os pacientes estudados. Bax é uma proteína de 21 kDa que acelera a apoptose através de ligações e antagonismo com o Bcl-2, o qual possui efeito inibidor na atividade de morte celular *in vivo*. Bax, geralmente, se encontra no citoplasma, mas através de estímulo apoptótico, Bax inicia uma mudança conformacional e desloca-se para a membrana mitocondrial, onde proporciona e media a liberação do citocromo-c do espaço da inter-membrana para o citosol, ativando a caspase 3 e perpetuando a cascata apoptótica (KORSMEYER. 1995). ZHANG et al. em 2003, avaliaram a expressão de Bcl-x, Mcl-1, proteínas inibidoras da apoptose e de Bax e Bad, proteínas promotoras da apoptose, em cultura de células e biópsias cutâneas de pacientes com micose fungóide. Os autores encontraram expressão dessas proteínas *in vitro* e *in vivo* sem diferenças de intensidade quando comparadas as lesões nos

diferentes estágios da doença. No entanto, as proteínas Bax e Bad, apesar de fortemente expressas, encontravam-se inativas, permitindo a conclusão de que nos LCCT, o equilíbrio entre promotores e inibidores de apoptose pende para as proteínas inibidoras, favorecendo a imortalidade das células neoplásicas.

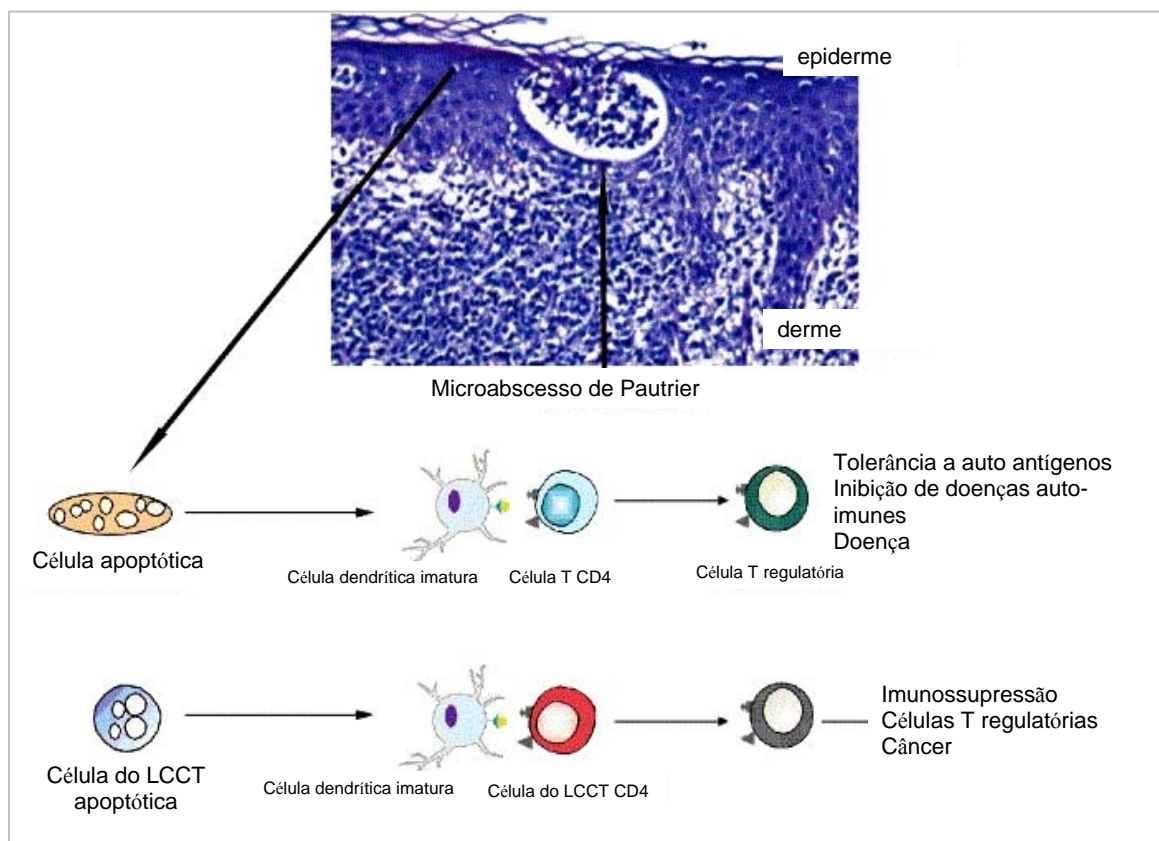
Nossos resultados não apresentaram diferenças de expressão de Bcl-2 e nem de Bax nos grupos estudados. A expressão de marcação de Bax foi forte em todos os pacientes, sendo que em apenas um paciente da forma indolente não foi possível avaliarmos essa proteína. Entretanto, como evidenciamos a diminuição da apoptose em todos os casos, através da expressão ausente da caspase 3, podemos afirmar que a inibição da apoptose foi um fenômeno presente em ambos os grupos e, portanto, a via intrínseca mediada pela caspase 9 pode estar bloqueada por Bcl-2 caso Bax, apesar de presente, apresentar-se sob a forma inativa, como foi verificado no trabalho de ZHANG et al. em 2003.

A avaliação do índice proliferativo entre os dois grupos demonstrou proliferação celular mais intensa nas formas evolutivas da doença com diferença estatisticamente significativa. Estudos realizados em pacientes com LCCT e linfomas não Hodgkin demonstraram índices proliferativos crescentes de acordo com a evolução clínica da doença (DUMMER et al. 1995; KORKOLOPOULOU et al. 1998). Entretanto, TURBITT e MACKIE em 1986 realizaram estudo comparativo entre 40 pacientes com micose fungóide e 23 pacientes com outros infiltrados linfocitários cutâneos não neoplásicos e obtiveram baixa positividade de Ki67 em um pequeno número de pacientes com micose fungóide e ausência de positividade nos infiltrados não neoplásicos. Para os autores, esses resultados poderiam sustentar a idéia de que, na micose fungóide, o acúmulo de células

tumorais seria resultante de células que se dividiram em sítio extra-cutâneo e não da proliferação de linfócitos T na pele. A melhor compreensão da etiopatogenia da micose fungóide contradiz essa idéia, pois se sabe que a resposta imune cutânea baseia-se na sensibilização das células de Langerhans por antígeno específico, na transformação das CL, que são células dendríticas imaturas, em células dendríticas maduras e sua migração para o linfonodo regional, onde sensibilizarão linfócitos T *naive* que proliferarão e retornarão à pele guiados pelo CLA (antígeno linfocitário cutâneo). Na pele, esses linfócitos continuarão a dividir-se por mecanismo ainda não elucidado, promovendo a proliferação dessas células.

A resposta imune anti-tumoral também segue o mesmo princípio. Os antígenos tumorais específicos da micose fungóide ainda não foram bem definidos. Uma das possibilidades seria a célula tumoral apoptótica, processada e apresentada pelas células dendríticas, atuar como antígeno. Essa apresentação cruzada do antígeno tumoral pode induzir a resposta imune anti-tumoral e promover a lise do tumor (BERARD et al. 2000; NOURI-SHIRAZI et al. 2000). No entanto, para tornar-se imunogênica, além da ingestão de corpos apoptóticos, as células dendríticas imaturas devem tornar-se maduras em resposta ao sinal de perigo. É descrito que tumores pequenos podem não liberar sinais de perigo ou podem suprimir a função apresentadora da célula dendrítica pela liberação de interleucina 10 e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), induzindo à tolerância tumoral (ENK et al. 1993; STEINBRINK et al. 1999; OHM e CARBONE 2001). A interleucina 10 é uma citocina do tipo TH2 produzida pelas células tumorais, especialmente nas fases avançadas da doença. LUFTL et al (2002) encontraram número progressivo de células IL10+ durante a progressão da doença, favorecendo

a hipótese da participação dessa interleucina nas fases avançadas da doença e sua contribuição para tolerância tumoral e, conseqüentemente, para a proliferação celular descontrolada. Estudos em modelo *in vitro* de LCCT demonstram que células dendríticas imaturas, ocupadas por células apoptóticas do LCCT, ligam-se ao TCR (receptor de células T) da célula T maligna e essas células passam a adquirir o fenótipo da célula Treg (T regulatória), expressando antígeno linfocitário citotóxico citoplasmático 4 (CTLA-4), Fox-P3 e CD25 e secretando citocinas imunossupressoras IL-10 e TGF- β (fator de crescimento tumoral) (BERGER et al. 2006) (Figura 18).



Legenda: a célula de Langerhans é uma célula dendrítica imatura posicionada na epiderme e que atua como a primeira célula apresentadora de antígeno. Possui papel importante na imunidade, na regulação de doenças auto-imunes e nos cânceres cutâneos. Elementos tissulares apoptóticos são ingeridos por células dendríticas imaturas e seus antígenos são processados e apresentados para o TCR das células T CD4+. Células de Langerhans imaturas podem migrar para o linfonodo regional, onde estimulam a resposta T regulatória e previnem o desenvolvimento de doenças auto-imunes. As células T malignas do LCCT assumem fenótipo de células T regulatórias, após a estimulação da apresentação de peptídeos próprios e suprimindo a resposta imune normal das células T. As células de Langerhans desempenham papel central no crescimento e expansão nessa forma de neoplasia cutânea.

Fonte: Adaptado de BERGER et al. (2006).

Figura 18 - Células de Langerhans na tolerância e no câncer.

Através da secreção IL-10 pela célula Treg tumoral, mantém-se a imaturidade da célula dendrítica e permite-se a fagocitose continuada e a apresentação de antígenos derivados das células apoptóticas, perpetuando a proliferação de células tumorais (BERGER et al. 2002, 2005 e 2006). Além do aumento da proliferação celular maligna, estudo demonstrou a expressão de FASL em todos os estágios da micose fungóide. Observou-se, entretanto, relação inversa entre FASL e linfócitos T CD8+ nas lesões cutâneas. Ou seja, nas áreas com alta concentração de FASL, encontraram-se baixas concentrações de células T CD8+ e em áreas com baixas concentrações de FASL, havia maior concentração das células T CD8+. Além disso, os autores observaram, através da técnica de TUNEL, que os linfócitos T CD8+, presentes nas áreas de alta concentração de FASL, apresentavam-se em apoptose. Esses autores concluíram que FASL, presente nas células neoplásicas de lesões de micose fungóide, pode ser capaz de induzir a apoptose dos linfócitos T CD8+ citotóxicos através da via de FAS-FASL (NI et al. 2001). A ativação da apoptose nos linfócitos T citotóxicos atuaria como mecanismo de escape tumoral, prejudicando a imunidade celular e, conseqüentemente, facilitando a proliferação do tumor.

A presença de índice proliferativo superior nos pacientes com a forma evolutiva pode ser conseqüente da alteração precoce do sistema imune através da diminuição dos linfócitos T citotóxicos (CD8+), facilitando a progressão das células tumorais. Nesses pacientes, a maior concentração de linfócitos neoplásicos intensifica a resposta imune TH2 e promove aumento de IL4, IL5 e IL10, que impede a maturação das células dendríticas e perpetua a resposta antigênica. Somado a isso, as células neoplásicas podem adquirir o fenótipo de linfócitos Treg e

produzir IL10 e TGF β , intensificando ainda mais a progressão do tumor. Nosso estudo não avaliou a concentração de células dendríticas, de linfócitos T CD8+, de IL10 nem mesmo a presença das células Treg, porém a diferença estatisticamente significativa do número de linfócitos neoplásicos entre os dois grupos leva-nos a pensar que esses fenômenos podem estar presentes mais precocemente nas formas evolutivas da doença.

Os resultados obtidos em nosso estudo nos permitem concluir que a apoptose é um fenômeno constante em todas as formas de apresentação clínica da micose fungóide. Através da interpretação dos nossos resultados e baseando-se na literatura existente, podemos inferir que nos estágios iniciais da micose fungóide a via intrínseca mediada por Bcl-2 pode estar bloqueada pela superexpressão de Bcl-2. Nessa fase, portanto, a inibição da apoptose promoveria o aumento das células neoplásicas, visto que, como observado em nossos pacientes, nas fases iniciais, o índice de proliferação das células neoplásicas, avaliado pela expressão da proteína Ki67, mostrou-se baixo. A supressão da apoptose levaria ao aumento progressivo das células tumorais promovendo a supressão da resposta imune através do desvio da resposta imune TH1 para TH2 por essas células. Haveria, portanto, aumento de IL4, IL5 e IL10 e diminuição de IL2, prejudicando a resposta imune tumoral pela diminuição de linfócitos T citotóxicos e permitindo que os linfócitos T neoplásicos adquiram o fenótipo de células T regulatórias e passem a atuar como antígenos tumorais. Baixos níveis de IL2, permitiriam a inibição da segunda via da apoptose através de c-FLIP promovendo aumento ainda maior da população de células tumorais. Dessa forma, a proliferação celular seria provocada inicialmente por defeito na via intrínseca da apoptose e, posteriormente, pela deficiência da resposta

imune anti-tumoral desencadeada pelas próprias células neoplásicas. O aumento das células malignas, além de perpetuar a resposta imune pela estimulação antigênica crônica, permitiria nas fases avançadas da doença, a inibição da via de FAS-FASL através de c-FLIP. Porém, estudos complementares avaliando a função dessas proteínas e a expressão de c-FLIP são necessários para confirmarmos essas suposições.

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente estudo comparando-se as formas estacionárias e rapidamente evolutivas da micose fungóide permitem concluir que:

1. A não-expressão da caspase 3 confirma que a supressão da apoptose é um mecanismo importante na patogênese da micose fungóide, independente da forma de apresentação e evolução clínica da doença.
2. A desregulação da apoptose não é determinante da evolução clínica da micose fungóide.
3. A proliferação celular aumentada provavelmente é o mecanismo celular que difere as formas rapidamente evolutivas das formas estacionárias da micose fungóide.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas AK, Lichtman AH. **Imunologia celular e molecular**. Trad. de E Palmeiro. 5 ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2005a. Células e tecidos do sistema imunológico; p.17-40.

Abbas AK, Lichtman AH. **Imunologia celular e molecular**. Trad. de E Palmeiro. 5 ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2005b. Anticorpos e antígenos; p.43-64.

Abbas AK, Lichtman AH. **Imunologia celular e molecular**. Trad. de L M B Santos. 5 ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2005c. Maturação dos linfócitos e expressão dos genes do receptor de antígenos; p.131-167.

Abbas AK, Lichtman AH. **Imunologia celular e molecular**. Trad. de A S Farias. 5 ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2005d. Tolerância imunológica; p.225-48.

Ackerman AB. If small plaque (digitate) parapsoriasis is a cutaneous T-cell lymphoma, even an 'abortive' one, it must be mycosis fungoides! **Arch Dermatol** 1996; 132:562-6.

Agnarsson BA, Kadin ME. Peripheral T-cell lymphomas in children. **Semin Diagn Pathol** 1995; 12:314-24.

Agnarsson BA, Vonderheid EC, Kadin ME. Cutaneous T cell lymphoma with suppressor/cytotoxic (CD8) phenotype: identification of rapidly progressive and chronic subtypes. **J Am Acad Dermatol** 1990; 22:569-77.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. **Biologia molecular da célula**. Trad. de J Frazzon. 4 ed. Porto Alegre: Artmed; 2004. Ciclo celular e morte celular programada; p.983-1026.

Alsaleh QA, Nanda A, Baker H, Al-Sabah H, Calonje E. Unilesional (segmental) mycosis fungoides presenting in childhood. **Pediatr Dermatol** 2004; 21:558-60.

Assunção Guimarães C, Linden R. Programmed cell deaths: apoptosis and alternative death styles. **Eur J Biochem** 2004; 271:1638-50.

Aster JC. Doenças de leucócitos, linfonodos, baço e timo. In: Kumar V, Abbas AK, Fausto N, editores. **Robbins e Cotran patologia: bases patológicas das doenças**. Trad. de D Corbett. 7 ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2005. p.695-746.

Axelrod PI, Lorber B, Vonderheid EC. Infections complicating mycosis fungoides and Sezary syndrome. **JAMA** 1992; 267:1354-58.

Berti E, Tomasini D, Vermeer MH, Meijer CJ, Alessi E, Willemze R. Primary cutaneous CD8-positive epidermotropic cytotoxic T cell lymphomas. A distinct clinicopathological entity with an aggressive clinical behavior. **Am J Pathol** 1999; 155:483-92.

Berard F, Blanco P, Davoust J, et al. Cross-priming of naive CD8 T cells against melanoma antigens using dendritic cells loaded with killed allogeneic melanoma cells. **J Exp Med** 2000; 192:1535-44.

Berger CL, Hanlon D, Kanada D, et al. The growth of cutaneous T-cell lymphoma is stimulated by immature dendritic cells. **Blood** 2002; 99:2929-39.

Berger CL, Tigelaar R, Cohen J, et al. Cutaneous T-cell lymphoma: malignant proliferation of T-regulatory cells. **Blood** 2005; 105:1640-7.

Berger CL, Vasquez JG, Shofner J, Mariwalla K, Edelson RL. Langerhans cells: mediators of immunity and tolerance. **Int J Biochem Cell Biol** 2006; 38:1632-6.

Braun FK, Fecker LF, Schwarz C, et al. Blockade of death receptor-mediated pathways early in the signaling cascade coincides with distinct apoptosis resistance in cutaneous T-Cell Lymphoma Cells. **J Invest Dermatol** 2007 May 10; [Epub ahead of print]

Bossi G, Griffiths GM. Degranulation plays an essential part in regulating cell surface expression of Fas ligand in T cells and natural killer cells. **Nat Med** 1999; 5:90-6.

Brown DC, Gatter KC. Ki67 protein: the immaculate deception? **Histopathology** 2002; 40:2-11.

Bunn PA Jr, Lamberg SI. Report of the Committee on Staging and Classification of Cutaneous T-Cell Lymphomas. **Cancer Treat Rep** 1979; 63:725-8.

Burg G, Dummer R, Haeffner A, Kempf W, Kadin M. From inflammation to neoplasia: mycosis fungoides evolves from reactive inflammatory conditions (lymphoid infiltrates) transforming into neoplastic plaques and tumors. **Arch Dermatol** 2001; 137:949-52.

Criscione VD, Weinstock MA. Incidence of cutaneous T-cell lymphoma in the United States, 1973-2002. **Arch Dermatol** 2007; 143:854-9.

Crowley JJ, Nikko A, Varghese A, Hoppe RT, Kim YH. Mycosis fungoides in young patients: clinical characteristics and outcome. **J Am Acad Dermatol** 1998; 38:696-701.

Dereure O, Portales P, Clot J, Guilhou JJ. Decreased expression of Fas (APO-1/CD95) on peripheral blood CD4+ T lymphocytes in cutaneous T-cell lymphomas. **Br J Dermatol** 2000; 143:1205-10.

Dereure O, Portales P, Clot J, Guilhou JJ. Decreased expression of fas (APO-1/CD95) on lesional CD4+ T lymphocytes in cutaneous T cell lymphomas: correlations with blood data. **Br J Dermatol** 2001; 145:1031-2.

Dereure O, Levi E, Vonderheid EC, Kadin ME. Infrequent Fas mutations but no Bax or p53 mutations in early mycosis fungoides: a possible mechanism for the accumulation of malignant T lymphocytes in the skin. **J Invest Dermatol** 2002; 118:949-56.

Di Pietro R, Zauli G. Emerging non-apoptotic functions of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)/Apo2L. **J Cell Physiol** 2004; 201:331-40.

Diamandidou E, Cohen PR, Kurzrock R. Mycosis fungoides and Sezary syndrome. **Blood** 1996; 88:2385-409.

Diamandidou E, Colome-Grimmer M, Fayad L, Duvic M, Kurzrock R. Transformation of mycosis fungoides/Sezary syndrome: clinical characteristics and prognosis. **Blood** 1998; 92:1150-9.

Dummer R, Michie SA, Kell D, et al. Expression of bcl-2 protein and Ki-67 nuclear proliferation antigen in benign and malignant cutaneous T-cell infiltrates. **J Cutan Pathol** 1995; 22:11-7.

Dummer R, Cozzio A, Urosevic M. Pathogenesis and therapy of cutaneous lymphomas--progress or impasse? **Exp Dermatol** 2006; 15:392-400.

Dutton A, O'Neil JD, Milner AE, et al. Expression of the cellular FLICE-inhibitory protein (c-FLIP) protects Hodgkin's lymphoma cells from autonomous Fas-mediated death. **Proc Natl Acad Sci USA** 2004; 101:6611-6.

Enk AH, Angeloni VL, Udey MC, Katz SI. Inhibition of Langerhans cell antigen-presenting function by IL-10. A role for IL-10 in induction of tolerance. **J Immunol** 1993; 151:2390-8.

Evans AV, Scarisbrick JJ, Child FJ, Acland KM, Whittaker SJ, Russell-Jones R. Cutaneous malignant melanoma in association with mycosis fungoides. **J Am Acad Dermatol** 2004; 50:701-5.

Ferenczi K, Fuhlbrigge RC, Pinkus J, Pinkus GS, Kupper TS. Increased CCR4 expression in cutaneous T cell lymphoma. **J Invest Dermatol** 2002; 119:1405-10.

Fink-Puches R, Chott A, Ardigo M, et al. The spectrum of cutaneous lymphomas in patients less than 20 years of age. **Pediatr Dermatol** 2004; 21:525-33.

Frampton J, Ramqvist T, Graf T. v-Myb of E26 leukemia virus up-regulates bcl-2 and suppresses apoptosis in myeloid cells. **Genes Dev** 1996; 10:2720-31.

Fuhlbrigge RC, Kieffer JD, Armerding D, Kupper TS. Cutaneous lymphocyte antigen is a specialized form of PSGL-1 expressed on skin-homing T cells. **Nature** 1997; 389:978-81.

Fung MA, Murphy MJ, Hoss DM, Grant-Kels JM. Practical evaluation and management of cutaneous lymphoma. **J Am Acad Dermatol** 2002; 46:325-57.

Gad F, Viau G, Boushira M, Bertrand R, Bissonnette R. Photodynamic therapy with 5-aminolevulinic acid induces apoptosis and caspase activation in malignant T cells. **J Cutan Med Surg** 2001; 5:8-13.

Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. **J Immunol** 1984; 133:1710-5.

Girardi M, Heald PW, Wilson LD. The pathogenesis of mycosis fungoides. **N Engl J Med** 2004; 350:1978-88.

Goldgeier MH, Cohen SR, Braverman IM, Stenn KS. An unusual and fatal case of disseminated cutaneous herpes simplex. Infection in a patient with cutaneous T cell lymphoma (mycosis fungoides). **J Am Acad Dermatol** 1981; 4:176-80.

Groves FD, Linet MS, Travis LB, Devesa SS. Cancer surveillance series: non-Hodgkin's lymphoma incidence by histologic subtype in the United States from 1978 through 1995. **J Natl Cancer Inst** 2000; 92:1240-51.

Hall PA, Richards MA, Gregory WM, d'Ardenne AJ, Lister TA, Stansfeld AG. The prognostic value of Ki67 immunostaining in non-Hodgkin's lymphoma. **J Pathol** 1988; 154:223-35.

Hoppe RT, Wood GS, Abel EA. Mycosis fungoides and the Sezary syndrome: pathology, staging, and treatment. **Curr Probl Cancer** 1990; 4:293-371.

Kanavaros P, Ioannidou D, Tzardi M, et al. fungoides: expression of C-myc p62 p53, bcl-2 and PCNA proteins and absence of association with Epstein-Barr virus. **Pathol Res Pract** 1994; 190:767-74.

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br J Cancer** 1972; 26:239-57.

Kikuchi A, Nishikawa T. Apoptotic and proliferating cells in cutaneous lymphoproliferative diseases. Department of Dermatology, Keio University School of Medicine, Tokyo, Japan. **Arch Dermatol** 1997; 133:829-33

Kim EJ, Hess S, Richardson SK, et al. Immunopathogenesis and therapy of cutaneous T cell lymphoma. **J Clin Invest** 2005; 115:798-812.

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; 139:857-66.

Korkolopoulou P, Angelopoulou MK, Kontopidou F, et al. Prognostic relevance of apoptotic cell death in non-Hodgkin's lymphomas: a multivariate survival analysis including Ki67 and p53 oncoprotein expression. **Histopathology** 1998; 33:240-7.

Korsmeyer SJ. Regulators of cell death. **Trends Genet** 1995; 11:101-5.

Kuppers R, Rajewsky K, Zhao M, et al. Hodgkin disease: Hodgkin and Reed-Sternberg cells picked from histological sections show clonal immunoglobulin gene rearrangements and appear to be derived from B cells at various stages of development. **Proc Natl Acad Sci USA** 1994; 91:10962-6.

Lamberg SI, Bunn PA Jr. Cutaneous T-cell lymphomas. Summary of the Mycosis Fungoides Cooperative Group-National Cancer Institute Workshop. **Arch Dermatol** 1979; 115:1103-5.

Latkowski JA, Heald P. **Dermatology in general medicine**. 6 ed. New York: McGraw-Hill; 2003. Cutaneous T cell lymphomas; p.1537-67.

Lavrik I, Golks A, Krammer PH Death receptor signaling. **J Cell Sci** 2005; 118:265-7.

Lever WF, Lever GS. **Histopatologia da pele**. Trad de N G Oliveira. 7 ed. São Paulo: Manole; 1991. Linfoma e leucemia; p 734-70.

Luftl M, Feng A, Licha E, Schuler G. Dendritic cells and apoptosis in mycosis fungoides. **Br J Dermatol** 2002; 147:1171-9.

Marafioti T, Hummel M, Anagnostopoulos I, et al. Origin of nodular lymphocyte-predominant Hodgkin's disease from a clonal expansion of highly mutated germinal-center B cells. **N Engl J Med** 1997; 337:453-8.

Meech,S; Edelson,R; Walsh,P; Norris,D; Duke,R. Reversible resistance to apoptosis in cutaneous T cell lymphoma. **Ann N Y Acad Sci** 2001; 941:46-58.

Muller AM, Ihorst G, Mertelsmann R, Engelhardt M. Epidemiology of non-Hodgkin's lymphoma (NHL): trends, geographic distribution, and etiology. **Ann Hematol** 2005; 84:1-12.

Nagata S, Golstein P. The Fas death factor. **Science** 1995; 267:1449-56.

Naoum, Paulo C. Avanços tecnológicos em hematologia laboratorial. **Rev Bras Hematol Hemoter** 2001; 23:111-9.

Ni X, Hazarika P, Zhang C, Talpur R, Duvic M. Fas ligand expression by neoplastic T lymphocytes mediates elimination of CD8+ cytotoxic T lymphocytes in mycosis fungoides: a potential mechanism of tumor immune escape? **Clin Cancer Res** 2001; 7:2682-92.

Ni X, Zhang C, Talpur R, Duvic M. Resistance to activation-induced cell death and bystander cytotoxicity via the Fas/Fas ligand pathway are implicated in the pathogenesis of cutaneous T cell lymphomas. **J Invest Dermatol** 2005; 124:741-50.

Nickoloff BJ, Griffiths CE. Intraepidermal but not dermal T lymphocytes are positive for a cell-cycle-associated antigen Ki-67 in mycosis fungoides. **Am J Pathol** 1990; 136:261-6.

Nouri-Shirazi M, Banchereau J, Bell D, et al. Dendritic cells capture killed tumor cells and present their antigens to elicit tumor-specific immune responses. **J Immunol** 2000; 165:3797-803.

Ohm JE, Carbone DP. VEGF as a mediator of tumor-associated immunodeficiency. **Immunol Res** 2001; 23:263-72.

Oyarzo MP, Medeiros LJ, Atwell C, et al. c-FLIP confers resistance to FAS-mediated apoptosis in anaplastic large-cell lymphoma. **Blood** 2006; 107:2544-7.

Picker LJ, Michie SA, Rott LS, Butcher EC. A unique phenotype of skin-associated lymphocytes in humans. Preferential expression of the HECA-452 epitope by benign and malignant T cells at cutaneous sites. **Am J Pathol** 1990; 136:1053-68.

Pielop JA, Brownell I, Duvic M. Mycosis fungoides associated with malignant melanoma and dysplastic nevus syndrome. **Int J Dermatol** 2003; 42:116-22.

Querfeld C, Guitart J, Kuzel TM, Rosen ST. Primary cutaneous lymphomas: a review with current treatment options. **Blood Rev** 2003a; 17:131-42.

Querfeld C, Rosen ST, Kuzel TM, Guitart J. Cutaneous T-cell lymphomas: a review with emphasis on new treatment approaches. **Semin Cutan Med Surg** 2003b; 22:150-61.

Qin JZ, Zhang CL, Kamarashev J, Dummer R, Burg G, Dobbeling U. Interleukin-7 and interleukin-15 regulate the expression of the bcl-2 and c-myb genes in cutaneous T-cell lymphoma cells. **Blood** 2001; 98:2778-83.

Ralfkiaer E. Controversies and discussion on early diagnosis of cutaneous T-cell lymphoma. Phenotyping. **Dermatol Clin** 1994; 12:329-34.

Rassidakis GZ, Jones D, Lai R, et al. BCL-2 family proteins in peripheral T-cell lymphomas: correlation with tumour apoptosis and proliferation. **J Pathol** 2003; 200:240-8.

Riedl SJ, Shi Y. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. **Nat Rev Mol Cell Biol** 2004; 5:897-907.

Saed G, Fivenson DP, Naidu Y, Nickoloff BJ. Mycosis fungoides exhibits a Th1-type cell-mediated cytokine profile whereas Sezary syndrome expresses a Th2-type profile. **J Invest Dermatol** 1994; 103:29-33.

Salomoni P, Perrotti D, Martinez R, Franceschi C, Calabretta B. Resistance to apoptosis in CTLL-2 cells constitutively expressing c-Myb is associated with induction of BCL-2 expression and Myb-dependent regulation of bcl-2 promoter activity. **Proc Natl Acad Sci USA** 1997; 94:3296-301.

Santucci M, Burg G, Feller AC. Interrater and intrarater reliability of histologic criteria in early cutaneous T-cell lymphoma. An EORTC Cutaneous Lymphoma Project Group study. **Dermatol Clin** 1994; 12:323-7.

Scaffidi C, Schmitz I, Krammer PH, Peter ME. The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis. **J Biol Chem** 1999; 274:1541-8.

Schluter C, Duchrow M, Wohlenberg C, et al. The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: a very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins. **J Cell Biol** 1993; 123:513-22.

Stinl G, Maurer D, Hauser C, Wolff K. **Dermatology in general medicine**. 6 ed. USA: McGraw-Hill; 2003. The skin: an immunologic barrier; p.253-73.

Swanbeck G, Roupe G, Sandstrom MH. Indications of a considerable decrease in the death rate in mycosis fungoides by PUVA treatment. **Acta Derm Venereol** 1994; 74:465-6.

Steinbrink K, Jonuleit H, Muller G, Schuler G, Knop J, Enk AH. Interleukin-10-treated human dendritic cells induce a melanoma-antigen-specific anergy in CD8(+) T cells resulting in a failure to lyse tumor cells. **Blood** 1999; 93:1634-42.

Taylor D, Badiani P, Weston K. A dominant interfering Myb mutant causes apoptosis in T cells. **Genes Dev** 1996; 10:2732-44.

Tormanen-Napankangas U, Soini Y, Kahlos K, Kinnula V, Paakko P. Expression of caspases-3, -6 and -8 and their relation to apoptosis in non-small cell lung carcinoma. **Int J Cancer** 2001; 93:192-8.

Turbitt ML, Mackie RM. An assessment of the diagnostic value of the monoclonal antibodies Leu 8, OKT9, OKT10 and Ki67 in cutaneous lymphocytic infiltrates. **Br J Dermatol** 1986; 115:151-8.

Van Doorn R, Van Haselen CW, van Voorst Vader PC, et al. Mycosis fungoides: disease evolution and prognosis of 309 Dutch patients. **Arch Dermatol** 2000; 136:504-10.

Vowels BR, Lessin SR, Cassin M, et al. Th2 cytokine mRNA expression in skin in cutaneous T-cell lymphoma. **J Invest Dermatol** 1994; 103:669-73.

Wallace AB. The exposure treatment of burns. **Lancet** 1951; 1:501-4.

Weber-Nordt RM, Egen C, Wehinger J, et al. Constitutive activation of STAT proteins in primary lymphoid and myeloid leukemia cells and in Epstein-Barr virus (EBV)-related lymphoma cell lines. **Blood** 1996; 88:809-16.

Weinstock MA, Gardstein B. Twenty-year trends in the reported incidence of mycosis fungoides and associated mortality. **Am J Public Health** 1999; 89:1240-4.

Weinstock MA. Epidemiology of mycosis fungoides. **Semin Dermatol** 1994; 13:154-9.

Weinstock MA, Horm JW. Mycosis fungoides in the United States. Increasing incidence and descriptive epidemiology. **JAMA** 1988; 260:42-6.

Willemze R, Jaffe ES, Burg G, et al. WHO-EORTC classification for cutaneous lymphomas. **Blood** 2005; 105:3768-85.

Willemze R, Meijer CJ. Classification of cutaneous T-cell lymphoma: from Alibert to WHO-EORTC. **J Cutan Pathol** 2006; 33 Suppl 1:18-26.

Yang E, Zha J, Jockel J, Boise LH, Thompson CB, Korsmeyer SJ. Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. **Cell** 1995; 80:285-91.

Zhang C, Hazarika P, Ni X, Weidner DA, Duvic M. Induction of apoptosis by bexarotene in cutaneous T-cell lymphoma cells: relevance to mechanism of therapeutic action. **Clin Cancer Res** 2002; 8:1234-40.

Zhang CL, Kamarashev J, Qin JZ, Burg G, Dummer R, Dobbeling U. Expression of apoptosis regulators in cutaneous T-cell lymphoma (CTCL) cells. **J Pathol** 2003; 200:249-54.

Zhang C, Richon V, Ni X, Talpur R, Duvic M. Selective induction of apoptosis by histone deacetylase inhibitor SAHA in cutaneous T-cell lymphoma cells: relevance to mechanism of therapeutic action. **J Invest Dermatol** 2005; 125:1045-52.

Zackheim HS, Amin S, Kashani-Sabet M, McMillan A. Prognosis in cutaneous T-cell lymphoma by skin stage: long-term survival in 489 patients. **J Am Acad Dermatol** 1999; 40:418-25.

Zoi-Toli O, Vermeer MH, De Vries E, Van Beek P, Meijer CJ, Willemze R. Expression of Fas and Fas-ligand in primary cutaneous T-cell lymphoma (CTCL): association between lack of Fas expression and aggressive types of CTCL. **Br J Dermatol** 2000; 143:313-9.

ANEXOS

Anexo 1 - Ficha de Registro de Dados

Identificação

Nome _____

Instituição _____

RGH _____

Endereço _____

Cidade _____ Estado _____

Cep _____

Telefone _____

Dados do paciente

Data de nascimento: ____/____/____

Naturalidade _____

Procedência _____

Profissão _____

Sexo () masculino () feminino

Cor () B () N () A () pardo/mulato () ignorado

Forma de evolução:

Estacionária - critérios:

1. Forma cutânea inicial ao diagnóstico – patches
2. Ausência de alteração no tamanho e no número de lesões em 5 anos
3. Mais de cinco anos de evolução antes do diagnóstico histológico

Rapidamente evolutiva – critérios:

1. Transição de lesão cutânea em menos de cinco anos
2. Não resposta ao tratamento convencional

3. Forma cutânea inicial ao diagnóstico – placas >10%sup. corpórea ou tumores.

Evolução	Estacionária	Rapidamente evolutiva

História Clínica

Forma de apresentação inicial: () patch/placa () placas () tumor

Início das lesões: _____ Idade ao diagnóstico: _____

Data do diagnóstico histológico ____/____/_____

Data da 1ª consulta ____/____/_____

Biópsias anteriores () sim () não

Caso sim, resultado: () dermatite inespecífica () Linfoma cutâneo

Tratamentos anteriores: () sim () não Qual(s)_____

Quadro Clínico

() patches () placas () tumor () outros _____

Localização das lesões:

() face, () tórax, () abdômen, () MMSS, () MMII () nádegas () dorso

Superfície corpórea () até 10% () > 10 %

Linfonodos palpáveis () cervical () axilar () inguinal () não palpável

Visceromegalias () sim () não Qual(s):

Alteração de M. Óssea () sim () não

Apresentação das lesões cutâneas no momento do diagnóstico histológico

Apresentação	Grupo T1	Grupo T2	Grupo T3
Sup.corp<10%	A	A	
Sup corp≥10%	B	B	

Grupo T1 Patches:

T1A – patches < 10% superfície corpórea

T1B – patches ≥10% superfície corpórea

Grupo T2 Patches e placas

T2A < 10% superfície corpórea

T2B ≥ 10% superfície corpórea

Grupo T3 Tumores

Evolução:

Apresentação clínica	5 anos até o diagnóstico	Diagnóstico histológico	5 anos após diagnóstico
T1A			
T1B			
T2A			
T2B			
T3			

Exames laboratoriais

Hemograma

- anemia () sim () não
- leucopenia () sim () não
- leucocitose () sim () não
- linfocitose () sim () não
- linfócitos morfológicamente alterados () sim () não
- Transaminases hepáticas () normais () alteradas _____
- DHL () normal () alterada _____
- Fosfatase alcalina () normal () alterada _____
- Pesquisa de células de Sezary () negativo () < 5% () > 5%
- HTLV1 e 2 () positivo () negativo- data do exame
- Relação CD4/CD8 () < 10 () > 10

Exames de imagem

- Raios de tórax () normal () alterado
- USG de abdômen () normal () alterado () não realizado
- USG de bases linfonodais () normal () alterado () não realizado
- Tomografia de tórax () normal () alterado () não realizado
- Tomografia de abdômen () normal () alterado () não realizada

Exame anátomo patológico

Pele

Resultado Lâmina	Não diagnóstico	Diagnóstico sugestivo	Diagnóstico compatível

Estadiamento clínico

() IA () IB () IIA () IIB () III() IVA ()IVB

Índice de proliferação - expressão

Lesão Marcador	Patches	Placa	Tumor
Ki67			

Índice de apoptose - expressão

Lesão Marcador	Patches	Placa	Tumor
Fas			
FasL			
Bcl2			
Caspase 3			

Anexo 2 - Distribuição das variáveis clínicas comparando-se as formas de evolução.

Tabela 1 - Distribuição das variáveis relacionadas ao local das lesões de acordo com evolução.

Variável	Categoria	Total	Grupos		p-valor
			Estacionária N (%)	Evolutiva N (%)	
Face	Não	21 (65,6)	17 (80,9)	4 (19,0)	0,002
	Sim	11 (34,4)	2 (18,2)	9 (81,8)	
Tronco	Não	3 (9,4)	2 (66,7)	1 (33,3)	0,999
	Sim	29 (90,6)	17 (58,6)	12 (41,4)	
Membros	Não	4 (12,5)	3 (75,0)	1 (25,0)	0,629
	Sim	28 (87,5)	16 (57,1)	12 (42,9)	
Nádegas	Não	11 (35,5)	8 (72,7)	3 (27,3)	0,452
	Sim	20 (65,5)	11 (55,0)	9 (45,0)	
Superfície corporal	Até 10%	9 (28,1)	7 (77,8)	2 (22,2)	0,249
	Acima 10%	23 (71,9)	12 (52,2)	11 (47,8)	

p-valor obtido pelo teste exato de Fisher

Tabela 2 - Distribuição das variáveis demográficas de acordo com evolução.

Variável	Medidas / Categoria	Total	Grupos		p-valor
			Estacionária N (%) /medida	Evolutiva N (%) /medida	
Sexo	Masculino	11 (34,4)	6 (54,5)	5 (45,4)	0,721
	Feminino	21 (65,6)	13 (61,9)	8 (38,1)	
Cor	Branco	21 (65,63)	10 (47,6)	11 (52,4)	0,128
	Não Branco	11 (34,3)	9 (81,8)	2 (18,2)	
Idade Diagnóstico	N	32	19	13	0,2574 *
	Min-Max	19-74	26-72	19-74	
	Mediana	46	44	58	
	Media (dp)	48,7 (16,0)	46,5 (14,0)	51,9 (18,6)	

p-valor obtido pelo teste exato de Fisher

* p-valor obtido pelo teste U de Mann-Whitney

dp = desvio padrão

Tabela 3 - Distribuição das variáveis relacionadas ao linfonodos de acordo com evolução.

Variável	Categoria	Total	Grupos		p-valor
			Estacionária N (%)	Evolutivo N (%)	
Linfonodos Totais	Não	17 (53,1)	13 (76,5)	4 (23,5)	0,070
	Sim	15 (46,9)	6 (40,0)	9 (60,0)	
Linfonodo Inguinal	Não	22 (68,7)	14 (63,6)	8 (36,4)	0,699
	Sim	10 (31,2)	5 (50,0)	5 (50,0)	
Linfonodo Cervical	Não	30 (93,7)	18 (60,0)	12 (40,0)	0,999
	Sim	2 (6,2)	1 (50,0)	1 (50,0)	
Linfonodo Axila	Não	25 (78,1)	17 (68,0)	8 (32,0)	0,091
	Sim	7 (21,9)	2 (28,6)	5 (71,4)	
Linfonodo Outros	Não	30 (93,7)	18 (60,0)	12 (40,0)	0,999
	Sim	2 (6,2)	1 (50,0)	1 (50,0)	

p-valor obtido pelo teste exato de Fisher

Tabela 4 - Distribuição das variáveis relacionadas ao grupo de apresentação e estadiamento de acordo com evolução.

Variável	Categoria	Total	Grupos	
			Estacionária N	Evolutivo N
Grupo Apresentação	T1A	7	7	0
	T1B	12	12	0
	T2A	1	0	1
	T2B	6	0	6
	T3	6	0	6
Estadiamento	IA	7	6	1
	IB	8	7	1
	IIA	11	6	5
	IIB	6	0	6

Anexo 3 - Relação dos principais estudos FAS, Bcl-2, Ki67

Quadro 1- A expressão de Ki-67 nos linfomas.

Autor	Conclusões
TURBITT e MACKIE 1986	As lesões cutâneas da micose fungóide são resultantes da proliferação de células em outros sítios e não na pele
KORKOLOPOULOU et al. 1998	Aumento da expressão de Ki-67 com o aumento do grau de malignidade dos linfomas
DUMMER et al. 1995	Nas fases iniciais da micose fungóide, a expressão abundante de Bcl-2 e baixa de Ki67 sugere que o acúmulo inicial das células neoplásicas seja facilitado pelo aumento da sobrevivência das mesmas.
Estudo em questão	A expressão de Ki67 foi significativamente maior nas formas evolutivas da micose fungóide p valor 0,0001

Quadro 2 - A expressão de FAS-FASL nos LCCT.

Autor	Conclusões
DEREURE et al. 2000	Diminuição da expressão de FAS em linfócitos periféricos CD4+ de LCCT.
ZOI-TOLI et al. 2000	Ausência da expressão de Fas foi associada a formas agressivas de LCCT.
MEECH et al. 2001	Linfócitos neoplásicos dos LCCT apresentam defeito na apoptose mediada por FAS-FASL.
DEREURE et al. 2002	Mutações do gene FAS foram encontradas em apenas 14% das células tumorais dos pacientes com LCCT.
NI et al. 2001	Inversão da distribuição de células neoplásicas FasL+ e linfócitos T CD8+ dentro do infiltrado das lesões de micose fungóide. Nos locais de alta concentração de células neoplásicas FasL+ havia pequena quantidade de linfócitos T CD8+.
BRAUN et al. 2007	A interrupção da via extrínseca (FAS-FASL) da apoptose pode corresponder a um importante mecanismo para o desenvolvimento dos linfomas.
Estudo em questão	A expressão de FAS-FASL foi semelhante nas formas estacionárias e rapidamente evolutivas da micose fungóide.

Quadro 3 - A expressão de Bcl-2 nos linfomas.

Autor	Conclusões
KANAVAROS et al. 1994	Avaliaram a expressão de c-Myc, Bcl-2, p53 e PCNA em pacientes com micose fungóide nas lesões iniciais tipo patches e nas lesões em placas e tumores e observaram aumento da expressão desses genes nas formas avançadas da doença. Evidenciando o aumento da proliferação celular através da expressão de PCNA e inibição da apoptose através de Bcl-2, c-Myc e p53.
DUMMER et al. 1995	A superexpressão de Bcl-2 e Bcl-x bem como a diminuição de membros pró-apoptóticos da família Bcl como Bax, Bak, Bik e Bid estão associados com a progressão tumoral. A expressão de Bcl-2 nos linfomas de células T parece refletir o estágio de desenvolvimento correspondente.
QIN et al. 2001	O aumento da proteína Bcl-2 nas células malignas do LCCT pode ser conseqüente da ação direta de c-Myb e STAT5 ativados pelas interleucinas 7 e 15. Nas fases iniciais da doença c-Myb pode aumentar a expressão de Bcl-2.
ZHANG et al. 2002	Nos LCCT, a expressão de Bcl-2 é encontrada nas células neoplásicas causando-lhes aumento da sobrevivência e promovendo resistência à radioterapia e fotoquimioterapia extra-corpórea.
RASSIDAKIS et al. 2003	Avaliaram a taxa de apoptose por TUNEL em 112 linfomas de células T (10 casos de micose fungóide) e correlacionaram os resultados com a expressão de Bcl-2. Nos casos Bcl-2 + as taxas de apoptose estavam diminuídas.
ZHANG et al. 2003	Avaliaram a expressão de Bcl-x, Mcl-1, Bax e Bad em cultura de células e biópsias cutâneas de pacientes com micose fungóide. Expressão positiva dessas proteínas <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> sem diferenças de intensidade quando comparadas as lesões nos diferentes estágios da doença. No entanto, as proteínas Bax e Bad, apesar de fortemente expressas encontravam-se inativas.
Estudo em questão	Bcl-2 apresentou-se fortemente expresso nas formas estacionárias e rapidamente evolutivas da micose fungóide.

Anexo 4 – Banco de dados

Quadro 1 - Banco de dados com os resultados da imunistoquímica.

Paciente	Evolução	Ki-67	Fas.	Fasl	Bcl2	Bax	Caspase 3
ADDS	estacionaria	7,4	positivo	positivo	positivo	positivo	negativo
APA	estacionaria	8,4	positivo	positivo	positivo	positivo	negativo
DMM	estacionaria	9,8	positivo	positivo	positivo	positivo	negativo
DSD	estacionaria	10,4	positivo	positivo	positivo	negativo	negativo
ESC	estacionaria	15,3	positivo	positivo	positivo	positivo	negativo
EAS	estacionaria	10,5	positivo	positivo	positivo	positivo	negativo
EPM	estacionaria	15,35	positivo	positivo	positivo	positivo	negativo
JDF	estacionaria	7,02	positivo	positivo	positivo	positivo	negativo
JTS	estacionaria	6,6	positivo	positivo	positivo	positivo	negativo
LHAR	estacionaria	16,4	positivo	positivo	positivo	positivo	negativo
MSM	estacionaria	3,75	positivo	positivo	positivo	positivo	negativo
VLN	estacionaria	7,3	positivo	positivo	positivo	positivo	negativo
MOG	estacionaria	3,9	positivo	positivo	não avalia.	positivo	negativo
NSS	estacionaria	10,1	positivo	positivo	positivo	positivo	negativo
AHS	estacionaria	6,7	positivo	positivo	positivo	positivo	negativo
MMS	estacionaria	19,8	positivo	positivo	positivo	positivo	negativo
TAN	estacionaria	5,85	positivo	positivo	positivo	positivo	negativo
MS	estacionaria	8	positivo	positivo	positivo	positivo	negativo
WSS	estacionaria	17,2	positivo	positivo	positivo	positivo	negativo
DFA	evolutiva	16,8	positivo	positivo	positivo	positivo	negativo
ENL	evolutiva	18,4	positivo	positivo	positivo	positivo	negativo
FAF	evolutiva	8,4	positivo	positivo	positivo	positivo	negativo
LST	evolutiva	49	positivo	positivo	positivo	positivo	negativo
MFA	evolutiva	49,6	positivo	positivo	positivo	positivo	negativo
MLT	evolutiva	9,4	positivo	positivo	positivo	positivo	negativo
MAMF	evolutiva	19,1	positivo	positivo	positivo	positivo	negativo
CBS	evolutiva	55,4	positivo	positivo	positivo	positivo	negativo
LAC	evolutiva	59,8	positivo	positivo	positivo	positivo	negativo
SFP	evolutiva	45,05	positivo	positivo	positivo	positivo	negativo
ALF	evolutiva	29,6	positivo	negativo	positivo	positivo	negativo
MJS	evolutiva	45,5	positivo	negativo	positivo	positivo	negativo
ML	evolutiva	50,5	positivo	positivo	positivo	positivo	negativo

Quadro 2 - Banco de dados com as variáveis clínicas estudadas.

protocolo	sexo	cor	evolucao	lesao	infeccoes	idade	diag	face	tronco	membros	nadegas	supcorpo	limfonodo	grupo	apri	estadiam
ADDS	masculino	pardofm	lat	estacionari	patches	30	46	não	sim	sim	não	>10%	sim	T1B		IIA
APA	feminino	pardofm	lat	estacionari	patches	15	72	não	sim	sim	sim	>10%	não	T1B		IB
DMM	feminino	branco		estacionari	patches	34	44	sim	sim	sim	sim	>10%	sim	T1B		IIA
DSD	masculino	negro		estacionari	patches	5	27	não	sim	sim	sim	>10%	não	T1B		IB
ESC	feminino	pardofm	lat	estacionari	patches	1	26	não	sim	sim	sim	>10%	sim	T1B		IIA
EAS	masculino	pardofm	lat	estacionari	patches	6meses	35	sim	sim	não	não	>10%	não	T1B		IB
EPM	feminino	pardofm	lat	estacionari	patches	20	46	não	sim	sim	sim	>10%	sim	T1B		IIA
JDF	feminino	pardofm	lat	estacionari	patches	15	38	não	sim	sim	não	>10%	não	T1B		IB
JTS	masculino	branco		estacionari	patches	4	41	não	sim	sim	sim	<10%	sim	T1A		IIA
LHAR	feminino	branco		estacionari	patches	8	45	não	sim	sim	não	>10%	sim	T1B		IIA
MSM	feminino	branco		estacionari	patches	25	46	não	sim	sim	sim	<10%	não	T1A		IA
VLN	feminino	pardofm	lat	estacionari	patches	3	44	não	sim	sim	não	<10%	não	T1A		IA
MOG	feminino	branco		estacionari	patches	15	68	não	não	sim	sim	<10%	não	T1A		IA
NSS	feminino	branco		estacionari	patches	6meses	66	não	sim	não	sim	<10%	não	T1A		IA
AHS	masculino	branco		estacionari	patches	3	40	não	sim	sim	sim	<10%	não	T1A		IA
MMS	masculino	branco		estacionari	patches	5	33	não	sim	sim	não	>10%	não	T1B		IB
TAN	feminino	pardofm	lat	estacionari	patches	7	65	não	sim	sim	não	>10%	não	T1B		IB
MS	feminino	branco		estacionari	patches	3	37	não	sim	sim	não	>10%	não	T1B		IB
WSS	masculino	branco		estacionari	patches	3	65	não	não	sim	sim	<10%	não	T1A		IA
DFA	feminino	branco		evolutiva	placas	1	19	não	sim	não	não	<10%	não	T2A		IA
ENL	feminino	branco		evolutiva	placas	5	47	sim	sim	sim	sim	>10%	não	T2B		IB
FAF	masculino	branco		evolutiva	tumor	3meses	60	sim	sim	sim	sim	>10%	sim	T3		IB
LST	feminino	pardofm	lat	evolutiva	placas	1	74	sim	sim	sim	sim	>10%	sim	T2B		IIA
MFA	feminino	pardofm	lat	evolutiva	tumor	1	54	sim	sim	sim	sim	>10%	não	T3		IB
MLT	masculino	branco		evolutiva	tumor	2	23	não	não	sim	não	<10%	sim	T3		IB
MAMF	feminino	branco		evolutiva	placas	20	61	não	sim	sim	sim	>10%	sim	T2B		IIA
CBS	masculino	branco		evolutiva	placas	1	55	sim	sim	sim	sim	>10%	sim	T2B		IIA
LAC	feminino	branco		evolutiva	tumor	2	24	sim	sim	sim	sim	>10%	sim	T3		IB
SFP	feminino	branco		evolutiva	tumor	1	60	sim	sim	sim	sim	>10%	não	T3		IB
ALF	masculino	branco		evolutiva	placas	6m	58	não	sim	sim	não	>10%	sim	T2B		IIA
MIS	feminino	branco		evolutiva	placas	8	69	sim	sim	sim	não	>10%	sim	T2B		IIA
ML	masculino	branco		evolutiva	tumor	5meses	71	sim	sim	sim	sim	>10%	sim	T3		IB