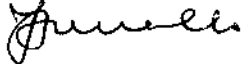


C.

**MARIANA MONTENEGRO DE MELO LIRA**

Este exemplar corresponde à versão final da Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Pós-Graduação Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, para obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas, área de Anatomia Patológica do(a) aluno(a) Mariana Montenegro de Melo Lira.  
Campinas, 04 de agosto de 2008.

Prof(a). Dr(a). José Vassallo   
Orientador(a)

**ESTUDO MORFOMÉTRICO DAS INFILTRAÇÕES  
LINFOCITÁRIAS CUTÂNEAS EM PREPARADOS  
IMUNOISTOQUÍMICOS**

**CAMPINAS**

**Unicamp**

**2008**

**MARIANA MONTENEGRO DE MELO LIRA**

**ESTUDO MORFOMÉTRICO DAS INFILTRAÇÕES  
LINFOCITÁRIAS CUTÂNEAS EM PREPARADOS  
IMUNOISTOQUÍMICOS**

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da  
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade  
Estadual de Campinas para Obtenção do título de  
Doutor em Ciências Médicas, área de concentração  
em Anatomia Patológica.

**ORIENTADOR: PROF. DR. JOSÉ VASSALLO**

**CAMPINAS**

**Unicamp**

**2008**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

L67e Lira, Mariana Montenegro de Melo  
Estudo morfométrico das infiltrações linfocitárias cutâneas em  
preparados imunoistoquímicos. / Mariana Montenegro de Melo Lira.  
Campinas, SP : [s.n.], 2008.

Orientador : José Vassallo  
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade  
de Ciências Médicas.

1. Linfoma. 2. Morfometria. 3. Imunoistoquímica. I.  
Vassallo, José. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade  
de Ciências Médicas. III. Título.

**Título em inglês :** Morphometric studie of the skin lymphocytic infiltrations on  
immunohistochemical preparation

Keywords: . **Lymphoma**  
. **Morphometry**  
. **Immunohistochemistry**

**Área de concentração :** Anatomia Patológica

**Titulação:**Doutor em Ciências Médicas

**Banca examinadora:** Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. José Vassallo  
Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Gilles Landman  
Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup> Roberto Pinto Paes  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Kátia Bórgia Barbosa Pagnano  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Carmem Silvia Passos Lima

**Data da defesa:** 04-08-2008

---

## **Banca examinadora da tese de Doutorado**

---

---

**Orientador : Prof. Dr. José Vassallo**

---

---

### **Membros:**

---

**1. Prof. Dr. Gilles Landman**

**2. Prof. Dr. Roberto Pinto Paes**

**3. Profa. Dra. Kátia Bórgia Barbosa Pagnano**

**4. Profa. Dra. Carmen Silvia Passos Lima**

**5. Prof. Dr. José Vassallo**

Curso de pós-graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

---

**Data: 04/08/2008**

---

## ***DEDICATÓRIA***

*Ao Henrique, meu eterno companheiro;*

*Aos meus pais, Vital Lira e Ana Maria Montenegro,  
pelo amor incondicional;*

*Aos meus amigos, presentes como uma família.*

## AGRADECIMENTOS

---

Ao Prof. Dr. José Vassallo, pelo exemplo de conhecimento, dedicação, confiança e paciência.

Ao Dr. André Almeida Schenka, pelo ajuda e ensinamentos indispensáveis à realização deste estudo.

À Prof. Dra. Maria Letícia Cintra e a Dra. Ana Cristina Cotta, pela atenção e ajuda na continuidade desta linha de pesquisa.

Ao Prof. Dr. Luis Alberto Magna, pela disponibilidade e auxílio na realização das análises estatísticas do presente estudo.

Ao meu pai, Vital Lira, pela inspiração e a ajuda na elaboração desta tese, com suas críticas e seus valiosos conhecimentos. À compreensão pela minha ausência e à confiança no meu trabalho da minha mãe, Ana Maria Montenegro de Melo, e da minha babá, Audenice Maria da Conceição (Nina).

Ao meu marido, Henrique de Ataíde Mariz, pelo amor, paciência e presença em todos os momentos da minha vida.

Aos colegas da pós-graduação, companheiros de um importante momento da minha vida, pela amizade, dedicação e troca de experiências.

Aos meus familiares e amigos, pelo apoio e enorme paciência.

Aos funcionários do Departamento de Anatomia Patológica – FCM/ UNICAMP, em especial a Maria do Carmo, pela ajuda e paciência.

*“O principal na vida não é o conhecimento,  
mas o uso que dele se pode fazer”*

**do Talmude**

	<b>PÁG.</b>
<b>RESUMO</b> .....	<i>xiv</i>
<b>ABSTRACT</b> .....	<i>xvi</i>
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	18
<b>Tecido linfóide associado à pele</b> .....	19
<b>Linfomas cutâneos primários</b> .....	21
Considerações Gerais.....	21
Classificação dos linfomas cutâneos primários.....	21
<b>Micose fungóide</b> .....	23
Aspectos histológicos.....	24
Aspectos imunofenotípicos.....	26
Aspectos imunogenéticos.....	27
Aspectos morfométricos.....	27
<b>Infiltrados linfóides cutâneos benignos</b> .....	29
<b>Técnicas utilizadas</b> .....	30
<b>Amostra</b> .....	35
<b>Justificativa</b> .....	38
<b>OBJETIVOS</b> .....	40
<b>ARTIGO</b> .....	42
<b>DISCUSSÃO</b> .....	57
<b>CONCLUSÃO</b> .....	62
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	64



<b>ANEXOS</b> .....	71
<b>Anexo 1-</b> Expressões do CD3 e do CD7 nos casos de micose fungóide e síndrome de Sézary.....	72
<b>Anexo 2-</b> Expressões do CD3 e do CD7 nos casos controle.....	73
<b>Anexo 3-</b> Valores das médias das variáveis morfométricas dos casos de micose fungóide e síndrome de Sézary.....	74
<b>Anexo 4-</b> Valores das médias das variáveis morfométricas dos casos do grupo controle.....	75
<b>Anexo 5-</b> Valores das médias das variáveis morfométricas/fases da micose fungóide e síndrome de Sézary.....	76
<b>Anexo 6-</b> Valores de corte das variáveis morfométricas estabelecidos pela curva ROC.....	77

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

<b>A</b>	Área
<b>BDLI</b>	Benign dermal lymphoid infiltrates (Infiltrados linfóides benignos dérmicos)
<b>CCR4</b>	Receptor de citocina 4
<b>CLA</b>	Cutaneous lymphocytic antigen (Antígeno linfocitário cutâneo)
<b>D</b>	Diâmetro
<b>Dmax</b>	Diâmetro máximo
<b>Dmin</b>	Diâmetro mínimo
<b>ECA</b>	Enzima conversora da angiotensina
<b>DP</b>	Desvio padrão
<b>EORTC</b>	European Organization for Research and Treatment of Cancer (Organização Européia para a Pesquisa e Tratamento do Câncer)
<b>F</b>	Feminino
<b>HLA</b>	Human leucocyte antigen (antígeno leucocitário humano)
<b>ICN</b>	Índice de contorno nuclear
<b>IHC</b>	Imunoistoquímica
<b>ILSL</b>	Instituto Lauro de Souza Lima
<b>ISCL</b>	International Society for Cutaneous Lymphoma (Sociedade Internacional de Linfomas cutâneos)
<b>LCCT</b>	Linfomas cutâneos de células T
<b>M</b>	Masculino

<b>MF</b>	Micose fungóide
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde
<b>P</b>	Perímetro
<b>PCR</b>	Polymerase chain reaction (reação em cadeia da polimerase)
<b>Puccamp</b>	Pontifícia Universidade Católica de Campinas
<b>PUVA</b>	Psoralen-ultravioleta A
<b>px</b>	Pixel
<b>ROC</b>	Receiver operating characteristic
<b>SD</b>	Standard deviation
<b>Unicamp</b>	Universidade Estadual de Campinas
<b>µm</b>	Micrômetro

## LISTA DE TABELAS

---

	<b>PÁG.</b>
<b>Tabela 1-</b> Frequência relativa e sobrevida em 5 anos de 1905 linfomas cutâneos primários classificados com a classificação WHO-EORTC.....	22
<b>Tabela 2-</b> Critérios histopatológicos para o diagnóstico da Micose fungóide.....	25
<b>Tabela 3-</b> Informações clínicas dos casos de Micose fungóide/ síndrome de Sézary.....	37
<b>Tabela 4-</b> Distribuição dos casos quanto à fase da Micose fungóide e síndrome de Sézary.....	38
<b>Tabela 5-</b> Informações clínicas dos casos do grupo controle.....	38
<b>Table 1 (artigo)-</b> Parâmetros morfométricos na Micose fungóide e nos infiltrados linfóides benignos.....	54

	<b>PÁG.</b>
<b>Figura 1-</b> Ativação do linfócito T de memória cutâneo, CLA positivo.....	20
<b>Figura 2 – A-</b> Calibração métrica - Imagelab®, 2000.....	33
<b>Figura 2 – B-</b> Calibração métrica - Imagelab®, 2000.....	34
<b>Figura 2 – C-</b> Calibração métrica - Imagelab®, 2000.....	35
<b>Figure 1 (artigo) – A-</b> Caso de Micose fungóide com células atípicas infiltrando derme superficial e permeando a epiderme (hematoxilina & eosina).....	55
<b>Figure 1 (artigo) – B-</b> Caso de Micose fungóide com marcação imunoistoquímica com CD3 mostrando positividade difusa nas células neoplásicas.....	55
<b>Figure 1 (artigo) – C-</b> Mesma imagem mostrada em B incluída no programa Imagelab, com demonstração da seleção de um núcleo para mensuração dos parâmetros morfométricos.....	55
<b>Figure 1 (artigo) – D-</b> Caso de Micose fungóide com marcação imunoistoquímica com CD7 mostrando positividade apenas em linfócitos T reativos.....	55
<b>Figure 2 (artigo) – A-</b> Gráfico (“Box plots”) dos valores da área nuclear.....	56
<b>Figure 2 (artigo) – B-</b> Gráfico (“Box plots”) dos valores do índice de contorno nuclear.....	56
<b>Figure 2 (artigo) – C-</b> Gráfico (“Box plots”) dos valores do perímetro nuclear.....	56

<b>Figure 2 (artigo) – D-</b>	Gráfico (“Box plots”) dos valores do diâmetro nuclear máximo.....	56
<b>Figure 2 (artigo) – E-</b>	Gráfico (“Box plots”) dos valores do diâmetro nuclear mínimo.....	56
<b>Figure 2 (artigo) – F-</b>	Gráfico da distribuição normal da área nuclear.....	56

**RESUMO**



A micose fungóide (MF) corresponde a cerca de 50% de todos os linfomas primários da pele. Trata-se de uma neoplasia epidermotrópica constituída por linfócitos atípicos, com fenótipo predominantemente de linfócito T CD4+. O diagnóstico da MF é freqüentemente muito difícil, tanto pela sobreposição com dermatoses benignas, como pela discordância entre achados clínicos e histopatológicos. Embora a certeza de malignidade repouse na observação do comportamento clínico, parâmetros histopatológicos, morfométricos e imunofenotípicos têm sido utilizados para indicar malignidade. Em estudos prévios realizados pelo nosso grupo, não confirmamos os achados de alguns autores, que enfatizam que níveis elevados da relação CD4:CD8 sugerem malignidade. Entretanto, tivemos a oportunidade de comprovar a utilidade da perda da expressão do marcador linfóide T, CD7, no diagnóstico das lesões linfomatosas. Neste último estudo, ficou-nos a impressão de que a ausência de expressão do CD7 era mais evidente em células linfóides mais volumosas e atípicas. Dando continuidade a esta linha de investigação, os objetivos do presente trabalho são os de determinar o papel da avaliação morfométrica em tecidos incluídos em parafina e submetidos à reação imunoistoquímica com CD3 na diferenciação das infiltrações linfocitárias cutâneas e determinar se existe correlação entre o aumento da área nuclear e o percentual de expressão do CD7 nestas lesões. Foram estudados 30 casos de MF e 11 casos de infiltrados linfóides cutâneos benignos. Imagens de 100 células positivas de cada caso foram capturadas e analisadas utilizando o sistema de análise de imagens Imagelab®, sendo mensurados perímetro (P), área (A) e diâmetros (D) nucleares e calculado o índice de contorno nuclear ( $ICN = P/\sqrt{A}$ ). Houve diferença estatisticamente significativa entre as médias de todas as variáveis ( $p < 0,05$ ), sendo *A* a variável com maior poder de discriminação entre os grupos ( $r^2 = 80,82\%$ ). E observou-se uma tendência de correlação entre a perda de expressão de CD7 e o aumento da área nuclear. Ficou, assim, demonstrado que a avaliação de parâmetros nucleares de células previamente identificadas como linfócitos T através da imunocoloração para o CD3 permite a diferenciação morfométrica entre MF e infiltrações linfocitárias benignas. Este método adiciona critérios objetivos para auxiliar no diagnóstico da MF.



**ABSTRACT**



Mycosis fungoides (MF) represents the most common skin lymphoid neoplasm. In initial stages, differential diagnosis of MF with other benign dermal lymphoid infiltrates (BDLI) may be impossible on morphological basis alone. In previous studies conducted by our group, only loss of immunoexpression of CD7 in MF proved to be of diagnostic help, but not the ratio between immunoexpression of CD4 and CD8. In the present study, 30 cases of MF and 11 cases of BDLI were analyzed, in order to compare morphometric parameters, which could be of diagnostic aid. As CD7 is frequently deleted in MF, immunohistochemical detection of T-cells was made using an antibody to CD3. Images of 100 CD3-positive cells per case in both groups were captured and analyzed using a simple computer program (Imagelab®) for nuclear perimeter (P), area (A), diameters (D) and nuclear contour index (NCI). All parameters showed statistically significant higher values for MF. Area was the variable with the strongest discriminating power between the two groups of patients. There was a tendency to a correlation between the loss of expression of CD7 and increase in nuclear area. Even if morphologic evaluation is not accurate to distinguish benign *versus* malignant dermal lymphoid infiltrates, due to the variability of size and shape of these cells, a more sensitive method promptly shows this difference. Our results suggest that morphometry of CD3-positive lymphoid cells may add valuable information in the differential diagnosis of MF and benign dermatoses.

# INTRODUÇÃO



## TECIDO LINFÓIDE ASSOCIADO À PELE

A pele é a primeira interface entre o corpo e o meio ambiente sendo exposta a um grande espectro de agressões, como agentes físicos, químicos e traumáticos. Estes ao comprometerem sua integridade possibilitam a entrada de microorganismos patogênicos. Desta forma a pele necessita de meios bastante efetivos para sua proteção, envolvendo tanto a imunidade inata quanto a imunidade adquirida, através do recrutamento de linfócitos T de memória. Dentre estes existe um grupo com capacidade de circular preferencialmente na pele, parecendo lembrar o sítio anatômico onde primeiro encontraram um antígeno. Estas células são identificadas por um marcador conhecido como antígeno linfocitário cutâneo (CLA - “cutaneous lymphocytic antigen”; Robert & Kupper, 1999). Embora sua função primária seja a vigilância imunológica, estes linfócitos T CLA positivos estão envolvidos em muitas doenças inflamatórias da pele (líquen plano, psoríase, dermatite de contato, dermatite atópica), na doença do enxerto versus hospedeiro e nos linfomas cutâneos de células T, como a micose fungóide (Girardi et al., 2004).

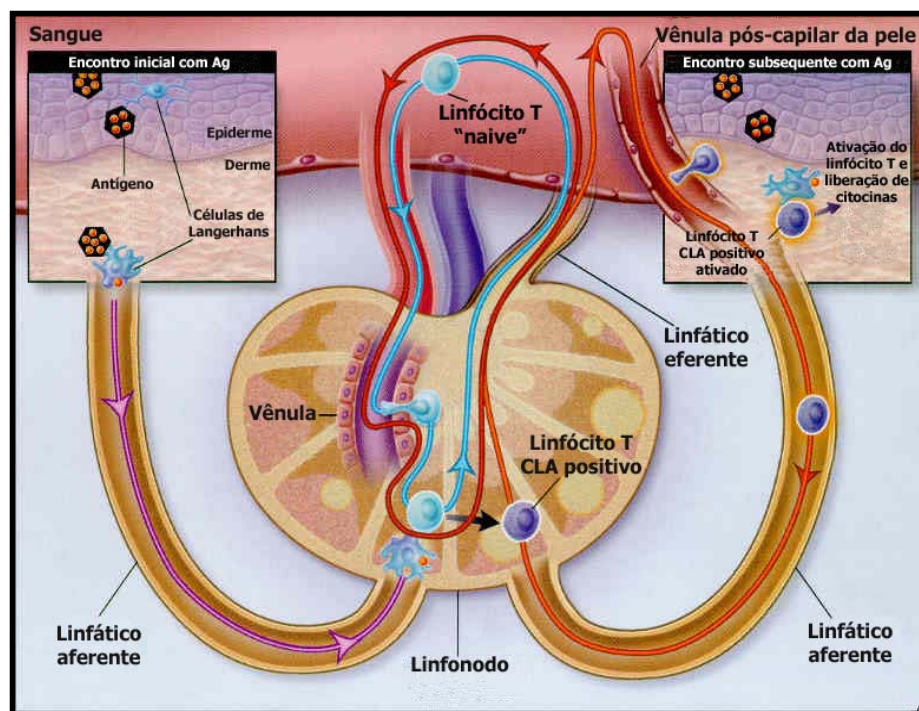
Esta organização regional do sistema imune ocorre através de interações moleculares que se iniciam com a apresentação de antígenos às células T. Células apresentadoras de antígenos residentes na pele (células de Langerhans e células dendríticas dérmicas) internalizam antígenos e migram para os linfonodos regionais. Após o processamento enzimático, epítopos antigênicos serão expostos na superfície celular ligados a moléculas HLA ou CD1. Quando uma célula T inativa (“naïve”) encontrar o antígeno para o qual é específica, ocorrerá a interação com o antígeno-HLA ou antígeno-CD1 com o receptor de antígeno da célula T. Desta forma o linfócito T será ativado e se tornará uma célula de memória. Estas células alteram seu perfil de expressão de moléculas de superfície e passam a expressar moléculas como o CLA e o receptor de quimiocina 4 (CCR4), as quais facilitam sua migração para a pele, tornando-se assim um “linfócito T cutâneo” (Figura 1; Robert e Kupper, 1999; Girardi et al., 2004).

A pele, diferentemente do linfonodo, não é um órgão de alojamento de linfócitos (“homing organ”). Entretanto, assim como nos linfonodos os linfócitos T e B apresentam-se distribuídos em camadas, sendo esta estrutura zonal esférica nos linfonodos e plana na pele. Os linfócitos B alojam-se preferencialmente na derme média e profunda e

nos espaços perivasculares. Os linfócitos T localizam-se em pequeno número na epiderme, em uma faixa subepidérmica, na derme papilar e perianexial e no tecido adiposo subcutâneo (Burg et al., 1995; Kempf et al., 1999).

Os infiltrados linfocitários cutâneos ocorrem em dois padrões básicos: difuso e nodular. O padrão difuso localiza-se ao longo da faixa subepidérmica e perianexial, com crescimento horizontal e vertical, respectivamente. Este padrão é típico dos infiltrados de células T, classicamente dos estágios iniciais dos linfomas cutâneos de células T (LCCT). O padrão nodular localiza-se primariamente na derme e cresce centrifugamente em todas as direções, sendo característico dos infiltrados de células B e linfomas de grandes células de ambas as linhagens (Burg et al., 1995; Kempf et al., 1999).

Alguns aspectos adicionais diferenciam os processos linfoproliferativos de linhagem T e B. Nos LCCT tipicamente a epiderme apresenta-se acantótica e papilomatosa, com freqüente epidermotropismo de células linfóides, não acompanhado por espongiose. Enquanto nos processos linfoproliferativos de células B a epiderme apresenta-se normal e separada do infiltrado por uma faixa de derme livre (Kempf et al., 1999).



**Figura 1-** Ativação do linfócito T de memória cutâneo, CLA positivo (modificado de Robert e Kupper, 1999).

## **LINFOMAS CUTÂNEOS PRIMÁRIOS**

### **Considerações gerais**

Diversas neoplasias hematológicas de células B e T podem envolver a pele, primária ou secundariamente. O termo linfoma cutâneo primário refere-se a linfomas cutâneos de células T e linfomas cutâneos de células B que se apresentam na pele sem nenhuma evidência de doença extra-cutânea ao diagnóstico. Depois do trato gastro-intestinal a pele é o sítio mais comum de linfomas não Hodgkin extranodais (Willemze et al., 2005).

Os linfomas cutâneos primários apresentam comportamento clínico e prognóstico diferentes dos linfomas sistêmicos, histologicamente similares. Também diferem quanto aos mecanismos moleculares envolvidos na patogênese e quanto a aspectos morfológicos que são típicos do sítio cutâneo. Existem ainda entidades exclusivas da pele, que apresentam características próprias, inclusive apresentando até regressão espontânea. E principalmente por requerer uma abordagem terapêutica diferente, este grupo de linfomas precisa ser estudado separadamente dos tumores dos tecidos linfóides e hematopoiéticos (Kempf et al., 1999; Willemze et al., 2005).

### **Classificação dos linfomas cutâneos primários**

Nos últimos anos, duas classificações foram utilizadas para os linfomas cutâneos primários: a da Organização Mundial de Saúde (OMS) e a da Organização Européia para Pesquisa e Tratamento do Cancer (EORTC - “European Organization for Research and Treatment of Cancer”). Recentemente, afim de sanar as imperfeições e diferenças destas classificações, realizaram-se reuniões de consenso das quais resultaram a nova classificação, denominada de OMS-EORTC (Tabela 1). Esta classificação elabora uma divisão dos linfomas cutâneos primários em três grupos (linfomas de células T e NK, de células B e neoplasia hematológica precursora) e distribui-os em linfomas de comportamentos clínicos indolente, intermediário e agressivo (Willemze et al., 2005).

Os linfomas cutâneos de células T (LCCT) constituem um grupo variado de neoplasias, caracterizadas pela expansão de células T malignas na pele. Este grupo inclui desde entidades indolentes, como a micose fungóide (MF), até extremamente agressivas,

como o linfoma de células NK/T cutâneo primário, do tipo nasal. A MF e a síndrome de Sézary (SS) representam cerca de 70% deste grupo (Koh et al., 1995; Willemze et al., 1997) e aproximadamente 50% de todos os linfomas cutâneos primários da pele (Willemze et al., 2005).

**Tabela 1-** Frequência relativa e sobrevida em 5 anos de 1905 linfomas cutâneos primários classificados de acordo com a classificação WHO-EORTC.

Classificação da Who-EORTC	Frequência (%)	Sobrevida em 5 anos (%)
<b>Linfoma cutâneo de células T</b>		
Comportamento clínico Indolente		
Micose fungóide (MF)	44	88
MF foliculotrópica	4	80
Reticulose pagetóide	<1	100
Pele laxa granulomatosa	<1	100
Linfoma de grandes células anaplásicas cutâneo primário	8	95
Papulose linfomatóide	12	100
Linfoma de células T subcutâneo paniculite-símile	1	82
Linfoma de células T pleomórficas CD4+ cutâneo primário	2	75
Comportamento clínico agressivo		
Síndrome de Sézary	3	24
Linfoma de células NK/T cutâneo primário, do tipo nasal	<1	PS
Linfoma agressivo de células T CD8+ cutâneo primário	<1	18
Linfoma de células T $\gamma/\delta$ cutâneo primário	<1	PS
Linfoma de células T periférico cutâneo primário, inespecífico	2	16
<b>Linfoma cutâneo de células B</b>		
Comportamento clínico Indolente		
Linfoma de células B da zona marginal cutâneo primário	7	99
Linfoma folicular cutâneo primário	11	95
Comportamento clínico intermediário		
Linfoma difuso de grandes células B cutâneo primário, tipo perna	4	55
Linfoma difuso de grandes células B cutâneo primário, outros	<1	50
Linfoma de grandes células B intravascular cutâneo primário	<1	65

PS: Perda de seguimento.

Modificado de Willemze et al., 2005

## MICOSE FUNGÓIDE

A MF foi primeiramente descrita por Alibert em 1806. Trata-se de uma neoplasia epidermotrópica constituída por linfócitos atípicos de imunofenótipo T, predominantemente CD4+ (auxiliares). Atualmente é reconhecida como o tipo mais comum de LCCT e corresponde a cerca de 50% de todos os linfomas cutâneos primários (Willemze et al., 2005).

A incidência anual da MF varia de 0,13 a 0,9/100000 habitantes (Suárez-Varela et al., 2000). Acomete tipicamente adultos, entre a quarta e sexta décadas, com idade média ao diagnóstico de 50 anos, mas pode ocorrer em crianças e adolescentes (Suárez-Varela et al., 2000; Willemze et al., 2005). Homens são mais acometidos que mulheres, numa proporção de 2:1 (Weinstock e Horm, 1988) e a raça negra apresenta maior incidência em vários registros (Weinstock e Horm, 1988; Koh et al., 1995).

A MF exibe comportamento clínico indolente, com progressão lenta em vários anos ou mesmo décadas. A doença afeta tipicamente áreas não expostas ao sol, sendo o tronco o principal local de envolvimento. São reconhecidas três fases clínicas clássicas, descritas inicialmente por Bazin, em 1876 (*apud* Koh et al., 1995): mancha eritematosa, placa e tumor. As lesões costumam evoluir através destas fases, mas elas podem ocorrer simultaneamente (Koh et al., 1995).

Na fase inicial de mancha as lesões são máculas eritematosas assimétricas, que podem ser descamativas, únicas ou múltiplas, assintomáticas ou intensamente pruriginosas. As lesões iniciais apresentam predileção pelas nádegas e outras áreas não expostas ao sol (Willemze et al., 2005). Pode ocorrer aspecto poiquilodérmico, caracterizado por atrofia cutânea associada à telangectasia, pigmentação mosqueada e discreta infiltração. Este achado é considerado relativamente específico para o diagnóstico da MF inicial, principalmente em casos de manchas poiquilodérmicas persistentes (Pimpinelli et al., 2005).

A evolução para a fase de placa ocorre num período variável de meses a anos. Nesta, as lesões costumam apresentar distribuição mais generalizada, são elevadas, infiltradas, bem demarcadas, com formatos irregulares, e, freqüentemente, acompanhadas



por prurido intenso. Pode ocorrer confluência das lesões, resultando em ilhas de pele normal (Kim e Hoppe, 1999).

Na fase tumoral, ocorre o aparecimento de nódulos castanho-avermelhados que surgem em placas preexistentes ou em pele previamente não afetada. O surgimento em placas de longa evolução reflete o crescimento de um subclone mais agressivo, em fase de crescimento vertical. Neste estágio as lesões ocorrem preferencialmente na face e em regiões de pregas cutâneas. Frequentemente há ulceração, podendo ocorrer infecção secundária. O início dos tumores é associado com uma sobrevida média de cerca de 2,5 anos (Koh et al., 1995).

O desenvolvimento de doença extracutânea se correlaciona com a extensão do envolvimento cutâneo. É extremamente raro em casos de doença limitada com manchas e placas, relativamente incomum em estágio de placas generalizadas (8%), sendo mais frequentemente observado em estágio de tumor (30%). Inicialmente, ocorre linfadenopatia regional, especialmente nos sítios de drenagem de áreas cutâneas extensamente envolvidas. Os órgãos internos mais afetados são pulmões, baço, fígado e trato gastro-intestinal (Kim e Hoppe, 1999; Koh et al., 1995).

O diagnóstico de MF é um dos mais difíceis em toda a histopatologia, sendo isto especialmente verdade para as lesões em fase inicial de manchas (Glusac, 2001). Não há critério seguro para seu diagnóstico e, desta forma, muitas vezes a certeza de malignidade baseia-se na evolução clínica. São descritos inúmeros critérios para auxiliar nesta definição, incluindo aspectos histológicos, imunofenotípicos, imunogenéticos e morfométricos.

### **Aspectos histológicos**

As lesões iniciais (manchas) exibem infiltrados liquenóides ou em faixa superficial, constituídos por histiócitos e linfócitos. Nesta fase as células atípicas de pequeno a médio tamanho, com núcleos hipercromáticos e convolutos (cerebriformes) são infreqüentes e encontram-se confinadas à epiderme, caracterizando o epidermotropismo. Estas células caracteristicamente colonizam a camada basal, isoladamente ou em fileira contígua, freqüentemente com halo claro perinuclear. Nas placas típicas o

epidermotropismo torna-se mais acentuado, surgindo os microabscessos de Pautrier (coleções intraepidérmicas de linfócitos atípicos). Na fase tumoral, o infiltrado dérmico torna-se mais difuso, ocorre diminuição do epidermotropismo e as células atípicas aumentam em número e em tamanho (Willemze et al., 2005).

Estudos recentes têm avaliado a sensibilidade e especificidade dos critérios histopatológicos no diagnóstico da MF (Glusac et al, 2003, Santucci et al, 2000, Smoller et al, 1995, Tabela 2). Considerando-os em conjunto observa-se que os **microabscessos de Pautrier** e a presença de **linfócitos epidérmicos mais volumosos que os dérmicos** são os critérios mais específicos, mas apresentam baixa sensibilidade. **Linfócito com halo claro perinuclear** é um critério específico, mas também pouco sensível. **Linfócitos contíguos** alinhados na camada basal, **linfócitos convolutos com diâmetro entre 7 e 9µm** e **padrão pagetóide** apresentam especificidade relativa. A presença de linfócitos epidérmicos acompanhados de pouca espongiose (“**espongiose desproporcionada**”) e **linfócitos convolutos** são considerados úteis, mas pouco específicos. A **fibrose da derme papilar** não demonstrou papel discriminante entre MF e dermatoses benignas.

**Tabela 2-** Critérios histopatológicos para o diagnóstico da micose fungóide

	Stanford		ISCL		EORTC	
	MF	Controles	MF	Controles	MF	Controles
Linfócitos epidérmicos > dérmicos	20%	0%	17%	3%	–	–
Microabscessos de Pautrier	37%	2%	17%	7%	4%	0%
Exocitose desproporcionada	58%	28%	37%	6%	–	–
Linfócitos na camada basal	67%	23%	17%	3%	46%	0%
Distribuição pagetóide	–	–	0%	0%	33%	0%
Linfócitos com diâmetro 7 e 9µm	–	–	–	–	100%	8%
Linfócitos convolutos	67%	32%	53%	12%	–	–
Linfócitos com halo	59%	13%	13%	0%	–	–
Fibrose da derme papilar	61%	49%	67%	63%	33%	100%

Stanford, estudo da universidade de Stanford; ISCL, estudo da “International Society for Cutaneous Lymphoma”; EORTC, “European Organization for Research and Treatment of Cancer”. Modificado de GLUSAC, 2003.

## **Aspectos imunofenotípicos**

As células neoplásicas na MF exibem fenótipo de linfócitos T maduros com positividade para anticorpos anti-CD3 e anti-CD45RO. Classicamente, apresentam positividade para anti-CD4, padrão típico de células T auxiliares, mas raros casos exibem positividade para o anti-CD8 e negatividade para o CD4. Esta peculiaridade não implica em diferenças clínicas ou prognósticas (Willemze et al., 2005).

Na maioria dos casos a imunofenotipagem falha em separar a MF das lesões inflamatórias cutâneas, porque a maior parte dos linfócitos em ambos os grupos apresentam o fenótipo de células T maduras, auxiliares. Existe controvérsia quanto à utilidade dos subtipos imunofenotípicos de células T no diagnóstico de MF, como a ocorrência de fenótipos aberrantes com perda da expressão de antígenos típicos da linhagem T, como CD2, CD3, CD5 e CD7. Esta perda de expressão antigênica costuma estar associada à progressão da neoplasia, sendo menos comum nas fases iniciais, e pode ser causada por mutações na expressão gênica ou pela emergência de um novo clone neoplásico (Michie et al., 1990).

A perda da expressão do marcador linfóide CD7 tem sido bastante estudada, com resultados apontando para sua aplicabilidade no diagnóstico das infiltrações linfocitárias cutâneas (Al Saati et al., 2001; Ormsby et al., 2001; Murphy et al., 2002). Em trabalho recente do nosso grupo foi demonstrada uma diferença estatisticamente significativa na expressão do CD7 entre infiltrações linfocitárias benignas e MF (Cotta et al., 2006). Entretanto, este achado deve ser interpretado com cautela, pois condições benignas, como o líquen plano, podem apresentar baixa expressão do antígeno CD7, e assim devem ser consideradas no diagnóstico diferencial (Ormsby et al., 2001; Cotta et al., 2006)

A perda da expressão do marcador linfóide CD5, demonstrou ser útil neste diferencial, apresentando uma especificidade de 100% para o diagnóstico de MF, quando a sua expressão é observada em menos de 50% das células T do infiltrado, mas este achado apresentou uma sensibilidade de apenas 10% (Pimpinelli et al., 2005). A discordância de expressão destes marcadores T entre os linfócitos intra-epidérmicos e dérmicos (deficiência

antigênica restrita à epiderme) apresentou associação significativa com o diagnóstico de MF, mas novamente com baixa sensibilidade. (Michie et al.,1990; Florell et al., 2006).

Outro aspecto em discussão é o valor da relação CD4:CD8. Alguns autores apontam que níveis elevados desta relação sugerem malignidade, com alta sensibilidade e especificidade (Izban et al.,1998; Nuckolsa et al.,1999; Florell et al, 2006). Todavia outros estudos não demonstraram especificidade do predomínio de linfócitos T CD4 no infiltrado, resultado este corroborado por estudo prévio do nosso grupo (Cotta et al., 2004).

### **Aspectos imunogenéticos**

O rearranjo gênico do receptor de célula T tem sido bastante estudado na expectativa de solucionar o problema diagnóstico da MF. Inicialmente, com a utilização de técnicas menos sensíveis, como o “southern blot”, ocorria elevado índice de falsos negativos (Wood et al., 1994). Com a introdução da técnica de amplificação gênica pela reação em cadeia da polimerase (PCR), a sensibilidade para detecção de clonalidade do receptor de célula T aumentou significativamente (sensibilidade de 90% com o PCR “versus” 59% com o “southern blot”, (Wood et al., 1994). Hoje esta clonalidade é observada na maioria dos casos de MF, apesar de não incomumente negativa em fases iniciais (Ponti et al., 2005).

A ocorrência de detecção de clonalidade em casos de desordens inflamatórias cutâneas, como pitiríase liquenóide, reações a droga, púrpura pigmentosa, pseudolinfoma e líquen plano, tem sido descrita e parece representar a identificação de clones de células T dominantes, não especificamente neoplásicos (*apud* Liu e McKee, 2002). Este achado limita a utilização desta técnica como critério absoluto de malignidade (Glusac, 2003).

### **Aspectos morfométricos**

A presença de núcleos cerebriformes, com contornos irregulares e convoluções é classicamente descrita nos infiltrados cutâneos da MF/SS. Este aspecto representa o foco de investigação dos estudos morfométricos, que buscam critérios diagnósticos para os infiltrados linfóides cutâneos (Crocker, 1983). O grau de irregularidade nuclear pode ser refletido pela expressão geométrica conhecida como índice de contorno nuclear (ICN). Este

foi descrito por Schrek (Schrek, 1972) num estudo ultra-estrutural sobre leucemia linfocítica crônica e aplicado no diagnóstico da síndrome de Sésary (SS) por Litovitz e Lutzner (Litovitz e Lutzner, 1974). O ICN é definido pela seguinte relação:  $\text{Perímetro}/\sqrt{\text{área}}$ . Um círculo perfeito apresenta um ICN igual a 3,54 ( $\text{ICN} = 2 \pi r$  (perímetro da circunferência) /  $\sqrt{\pi r^2}$  (área da circunferência) =  $2/\sqrt{\pi} = 3,54$ ). À medida que a forma se desvia da perfeição do círculo, ocorre um aumento no valor deste índice.

A utilidade deste parâmetro morfológico no diagnóstico da MF foi primeiramente avaliada por Meijer e colaboradores. Estes autores demonstraram que infiltrados cutâneos iniciais da MF apresentam médias de ICN mais elevadas que os infiltrados benignos. (Meijer et al., 1980) Seguiram-se estudos morfométricos ultra-estruturais que buscaram estabelecer critérios diagnósticos de malignidade para os infiltrados linfóides cutâneos. van der Loo e colaboradores demonstraram que a presença de células com  $\text{ICN} \geq 11,5$  e em elevada frequência definem o diagnóstico de MF com uma probabilidade maior que 95% (van der Loo et al., 1981). Em estudo aparentemente simultâneo, McNutt e Crain sugeriram que dois critérios eram necessários para o diagnóstico de MF: média do ICN  $\geq 6,1$  e pelo menos 6% das células com  $\text{ICN} \geq 9,0$ . (McNutt e Crain, 1981) Seguidamente, McNutt e colaboradores demonstraram elevado poder discriminatório entre dermatoses benignas e MF ao associar o percentual de células com  $\text{ICN} \geq 7$  e o percentual de células com área nuclear  $> 30\mu\text{m}^2$ . (McNutt et al., 1981).

Estudos subseqüentes continuaram atestando o poder diagnóstico dos parâmetros morfométricos no diagnóstico da MF, utilizando a microscopia eletrônica (Payne et al., 1984, Shum et al., 1986, Payne et al., 1986). Apenas Eng e colaboradores não demonstraram diferença estatisticamente significativa entre o ICN nos casos de MF (em diferentes estágios) e dermatoses benignas (Eng et al., 1981).

Um aspecto discutido na realização dos trabalhos morfométricos era a possibilidade de mensuração de células não linfóides, considerando que os critérios ultra-estruturais aplicados para diferenciar linfócitos e histiócitos eram os descritos para linfócitos benignos e histiócitos em condições benignas, não considerando possíveis alterações estruturais destas células no contexto da MF. Uma maneira de solucionar esta questão é mensurar apenas células linfóides previamente identificadas como linfócitos T,

utilizando anticorpos monoclonais. Hashimoto e Iwahara realizaram estudos com microscopia imunoeletrônica e calcularam o ICN em células previamente marcadas com o anticorpo monoclonal, anti-Leu-1 (Pan-T). Eles demonstraram presença de células de aspecto cerebriforme que não eram de linhagem T e que exibiam, por vezes, valores de ICN mais elevados que os linfócitos neoplásicos (Hashimoto e Iwahara, 1983). E atestaram o papel do ICN no diagnóstico da MF, quando 25% ou mais das células do infiltrado cutâneo apresentam  $ICN > 6,5$  (Iwahara e Hashimoto, 1984).

Na tentativa de tornar o estudo morfométrico menos dispendioso e mais aplicável ao diagnóstico de rotina, autores desenvolveram estudos com microscopia óptica, utilizando cortes semi-finos (material embebido em resina epóxi) e finos (material embebido em parafina). Lessana-Leibowitch e colaboradores e Sinha e colaboradores demonstraram a utilidade dos parâmetros morfométricos nucleares, analisados sob microscopia óptica, no diagnóstico da MF (Lessana-Leibowitch et al., 1984, Sinha et al., 2003). Utilizando material incluído em parafina, Rieger e colaboradores encontraram poder discriminatório ao associar as médias da área e diâmetro nucleares com parâmetros esteriológicos (densidade de volume e densidade numérica). Entretanto, não encontraram utilidade diagnóstica para o Fator Forma (parâmetro de irregularidade nuclear utilizado e definido como:  $4\pi \times \text{área}/\text{perímetro}^2$ ), análogo do ICN (Rieger et al., 1989).

## **INFILTRADOS LINFÓIDES CUTÂNEOS BENIGNOS**

A infiltração linfocitária superficial e/ou profunda da pele representa o substrato histopatológico de diversas entidades clínicas. Dentre elas destacam-se o linfoma e inúmeros quadros benignos como lúpus eritematoso, erupção polimorfa à luz, linfocitoma cútis, infiltração linfocitária da pele (de Jessner), hanseníase, líquen estriado, necrobiose lipoídica reações a picadas de insetos, eritemas migratórios, esclerodermia generalizada, farmacodermia, púrpura liquenóide crônica, líquen escleroso, líquen plano e eritema multiforme (Ming e LeBoit, 2000; Santucci et al., 2000)

Devido à freqüente sobreposição com dermatoses benignas, a MF pode ser considerada o “maior imitador” da atualidade, designação antigamente concedida à sífilis (Zackheim e McCalmont, 2002). Esta semelhança com inúmeras dermatites ocorre tanto na

clínica como na histologia. Clinicamente, ela pode simular desde dermatite atópica ou eczematososa, psoríase e erupções a drogas até pioderma gangrenoso, vitiligo, ictiose adquirida, contabilizando mais de 25 dermatoses com as quais pode ser confundida. Histologicamente, a MF pode assumir quase todos os padrões encontrados em doenças inflamatórias e cada um deles irá determinar um leque de diagnósticos diferenciais, como dermatites espongíóticas (pitiríase rósea, dermatite numular), psoríaseiformes (psoríase, líquen simples crônico) e dermatites de interface (líquen plano, líquen nítido, sífilis secundária); (Zackheim e McCalmont, 2002; Ming e LeBoit, 2000).

Um importante diagnóstico diferencial da MF são os pseudolinfomas T. Estes representam um grupo heterogêneo de entidades que simulam microscopica e clinicamente os linfomas de células T cutâneos e apresentam etiologias diversas, como reações à droga, reações a venenos de artrópode, dermatite de contato alérgica (por níquel, cobalto, cromato e borracha) e reticulose actínica. A reação linfomatóide a droga é a causa mais comum de simulação de desordem linfoproliferativa cutânea. Ela pode ser induzida por vários agentes, mas está mais frequentemente associada ao uso de anticonvulsivantes (fenitoína, hidantoína e carbamazepina), inibidores da ECA, atenolol, anti-histamínicos, ciclosporina e alopurinol. Os eosinófilos, quando presentes, favorecem o diagnóstico de pseudolinfoma e a resolução do quadro com a interrupção da medicação irá estabelecê-lo (Liu e McKee, 2002).

## **TÉCNICAS UTILIZADAS**

### **Imunoistoquímica**

A imunoistoquímica é um método utilizado para localizar a presença de antígenos específicos em células e tecidos baseado numa reação de reconhecimento entre antígeno e anticorpo. Desta forma, através do perfil antigênico encontrado é possível caracterizar o tipo celular ou tecido em estudo.

Através da utilização de anticorpo direcionado para o CD3 é possível identificar os linfócitos T presentes num infiltrado linfóide cutâneo. No presente trabalho foi utilizada esta marcação para permitir um posterior estudo morfométrico mais específico,

mensurando apenas células previamente identificadas imunofenotipicamente como linfócitos T, e assim evitando a mensuração de células não linfóides (Hashimoto e Iwahara, 1983; Hashimoto e Iwahara, 1984).

Como discutido acima, a constatação da perda da expressão de determinados antígenos considerados linhagem específica pode representar um sinal de malignidade. Mais especificamente, no estudo da MF a perda da expressão do CD7, marcador de linfócitos T, tem demonstrado ser um aspecto importante no diagnóstico diferencial com dermatoses benignas, favorecendo o diagnóstico de MF.

A fim de correlacionar a expressão do CD7 nos infiltrados linfóides cutâneos com os achados morfométricos do presente trabalho, foram utilizados os resultados do estudo anterior do nosso grupo de pesquisa, realizado com a mesma casuística, cujas tabelas estão reproduzidas nos anexos 1 e 2 (Cotta et al., 2006)

O estudo imunoistoquímico foi realizado em secções histológicas de 5 µm de espessura. Os anticorpos usados eram direcionados para o CD3 [policlonal, DAKO, Carpinteria, CA, USA, diluição 1:50] e para o CD7 [CBC.37, Toulouse, França, diluição 1:20]. A recuperação antigênica foi realizada com calor úmido e o polímero EnVision [DAKO] foi utilizado para amplificar a reação. As reações foram realizadas com controles positivos e negativos apropriados. A revelação foi feita com 3,3-tetraidrocloreto de diaminobenzidina [Sigma, St. Luis, MO, USA] e contracorada com hematoxilina de Mayer.

### **Morfometria**

O princípio básico da morfometria informatizada é a transformação de imagens em números, possibilitando a análise por programas especializados. Através da análise destes números obtém-se dados objetivos e reproduzíveis, diminuindo, assim, a subjetividade nas análises histopatológicas. As variações na forma, tamanho e textura celular podem ser avaliadas por parâmetros quantitativos, como área, perímetro, diâmetro (Sokol et al., 1991; Atalag et al., 2003). Estes, quando aplicados a situações diagnósticas ardilosas podem aumentar a reprodutibilidade, como em casos de determinação da presença de atipia nuclear e grau de displasia em lesões pré-malignas e malignas



(Montironi et al., 2000; Kirillov et al., 2001; Baak et al., 2002; Hsu et al., 2005; Lim et al., 2006). A avaliação das características nucleares é de especial interesse para a morfometria, devido à existência de correlação entre estes aspectos com grau de diferenciação tumoral, estágio de ciclo celular e mesmo agressividade das neoplasias (*apud* Payne et al., 1990).

Na MF o foco do estudo morfométrico é o tamanho e a forma nuclear, através da tentativa de mensuração do grau de irregularidade e convoluções, classicamente proeminentes nas células cerebrifomes da MF e síndrome de Sézary (SS).

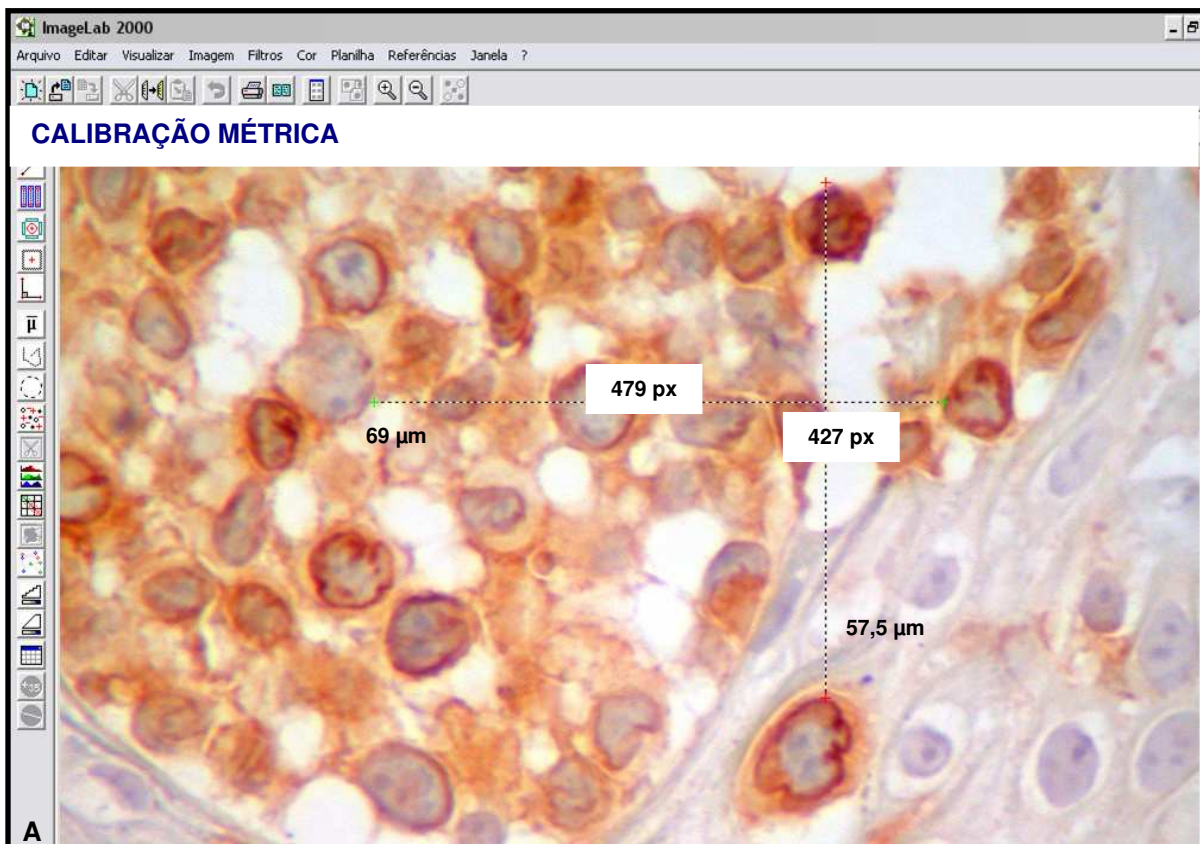
No presente estudo a avaliação morfométrica foi realizada no sistema de análise de imagens, Imagelab®, 2000. A captura das imagens foi feita com uma câmera de vídeo (Powershot G5, Canon®) acoplada a um microscópio óptico (Axiophot, Zeiss)

O número de campos microscópicos fotografados em cada caso foi dependente do número de células linfóides presentes nas preparações, sendo selecionados de cinco (05) a dez (10) áreas por caso. A captura foi realizada usando a objetiva de 40X. Foram mensurados de cada caso 100 núcleos de células linfóides T, previamente marcadas com o anti-CD3. Para a mensuração, cada núcleo foi selecionado isoladamente e manualmente.

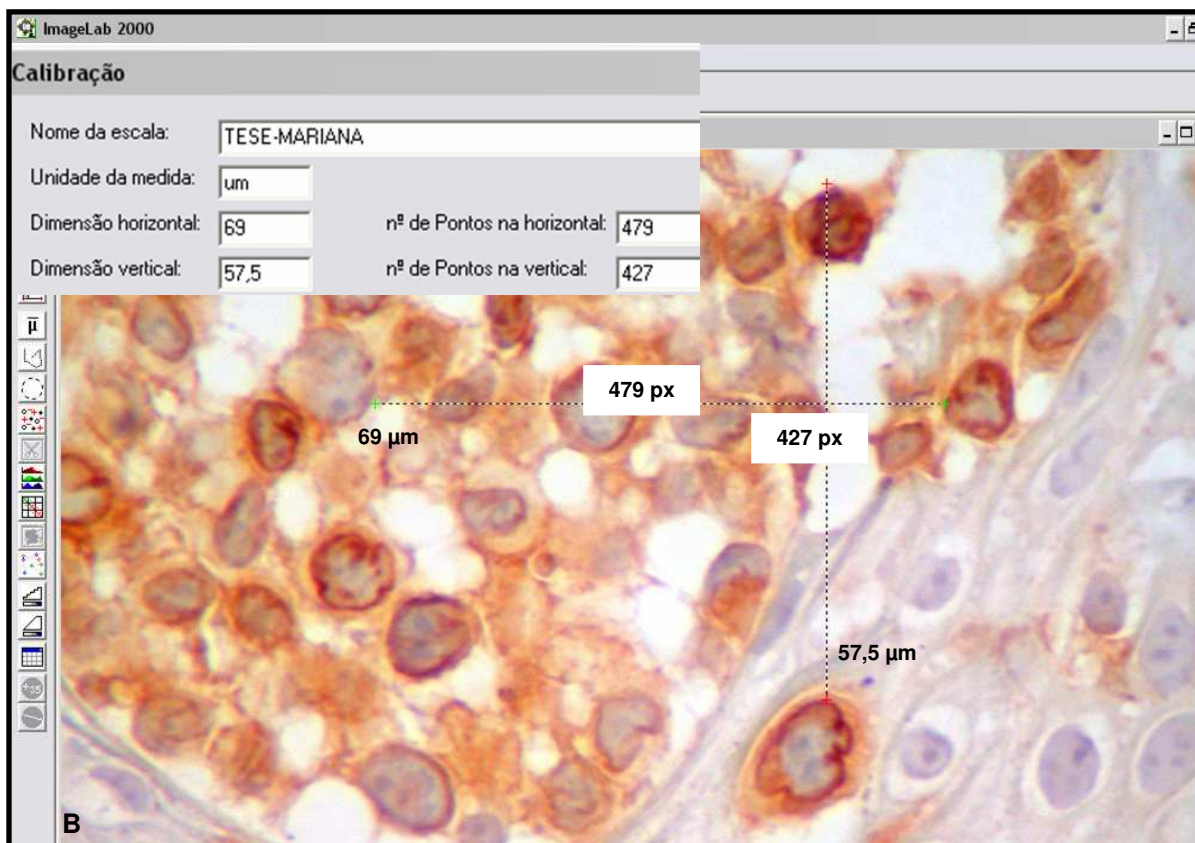
Após a seleção do núcleo a ser mensurado o programa fornece a **área**, o **perímetro** e os **diâmetros máximo e mínimo** nucleares. Utilizando as medidas da área e do perímetro foi calculado o **índice de contorno nuclear (ICN)**. Como descrito acima, este índice é uma expressão geométrica definida como o perímetro do núcleo dividido pela raiz quadrada da área nuclear,  $ICN = \text{Perímetro} / \sqrt{\text{área}}$  (Schrek, 1972). Ele é considerado um parâmetro que descreve o formato do núcleo, possibilitando uma mensuração objetiva da convolução nuclear.

O programa de análise de imagens realiza todas as mensurações em unidades de pixel (px). Para obter os resultados das mensurações em unidade de micrômetro ( $\mu\text{m}$ ) foi efetuada uma calibração métrica, estabelecendo assim a correspondência do pixel (altura e largura) com o micrômetro. Para isto foi utilizada uma lâmina na qual as distâncias entre dois pontos na vertical e dois pontos na horizontal foram previamente estabelecidas

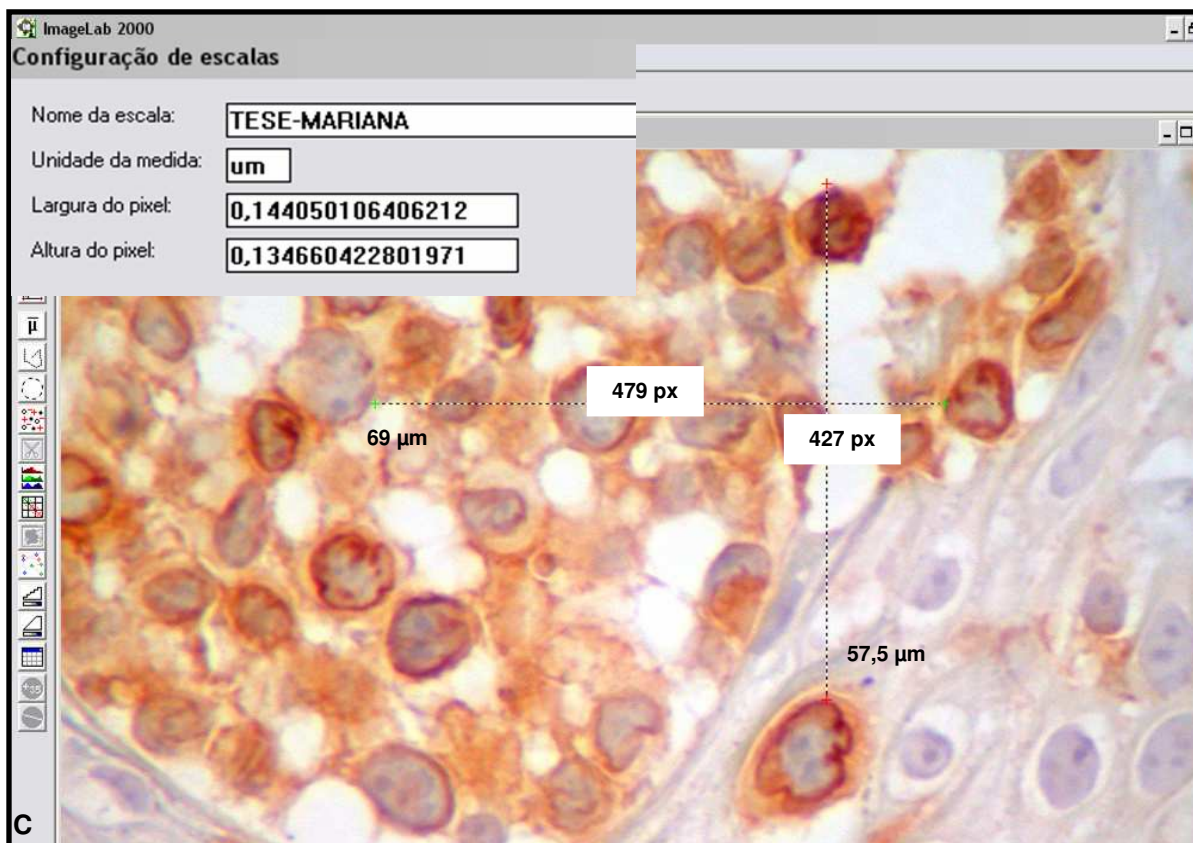
utilizando a escala de uma ocular milimetrada. Foi capturada uma imagem destes pontos, utilizando o mesmo sistema de captura e no mesmo aumento do microscópio no qual foram realizadas as capturas dos casos estudados. Esta imagem foi aberta no sistema de análise e, através dela, foi estabelecido o valor em unidades de pixel das distâncias entre os pontos (verticais e horizontais). Ao correlacionar o valor encontrado em pixel com o previamente estabelecido em  $\mu\text{m}$  determina-se quanto vale o pixel (altura e largura) em unidade de micrômetros, nas imagens analisadas.



**Figura 2 A-** Calibração métrica - Imagelab®, 2000. As distâncias em micrômetros entre os pontos horizontais ( $69 \mu\text{m}$ ) e verticais ( $57,5 \mu\text{m}$ ) foram estabelecidas com uma ocular milimetrada. As respectivas distâncias em unidades de pixel (479 px e 427 px) são fornecidas pelo programa de análise de imagem (Imagelab®).



**Figura 2 B-** Calibração métrica - Imagelab®, 2000. As distâncias em micrômetros entre os pontos horizontais (69 µm) e verticais (57,5 µm) são fornecidas ao sistema de calibração do programa de análise de imagem (Imagelab®), para correlação com os valores em unidades de pixel (479 px e 427px) .



**Figura 2 C-** Calibração métrica - Imagelab®, 2000. A correlação entre dos valores das distâncias em micrômetros ( $69\ \mu\text{m}$  e  $57,5\ \mu\text{m}$ ) e em unidades de pixel ( $479\ \text{px}$  e  $427\ \text{px}$ ) é realizada pelo sistema de calibração do programa de análise de imagem (Imagelab®), determinando quanto vale o pixel (altura e largura) em unidade de micrômetros.

## AMOSTRA

Os pacientes incluídos neste estudo são de três instituições: Universidade estadual de Campinas (Unicamp), Pontifícia Universidade Católica de Campinas (PUCCAMP) e Instituto Lauro de Souza Lima (ILSL). A amostra é composta por 30 casos de micose fungóide (MF) /síndrome de Sézary (SS) e 11 casos de infiltrados linfóides cutâneos benignos. Estes casos correspondem aos previamente estudados por Cotta e colaboradores (Cotta et al., 2006), a fim de permitir a comparação entre os resultados dos dois estudos.

Os casos de MF/SS incluídos foram localizados a partir da revisão de 114 prontuários médicos de pacientes do departamento de Dermatologia da Unicamp, no período de 1989 a 2003, dentre os quais havia 33 linfomas cutâneos de células T. Destes 25 casos preenchiam critérios diagnósticos para micose fungóide ou síndrome de Sésary, tinham ou estavam em seguimento clínico e apresentavam material incluído em parafina disponível para estudo imunoistoquímico. Foram incluídos ainda, a fim de aumentar a amostra estudada, três casos do Instituto Lauro de Souza Lima e dois da Pontifícia Universidade Católica de Campinas.

A escolha da biópsia incluída no estudo, baseou-se primeiramente na disponibilidade dos blocos de parafina e material suficiente nestes para realização do estudo imunoistoquímico. Nos casos de pacientes com mais de uma biópsia adequada, foi selecionada a primeira biópsia que exibisse características suspeitas de MF, ou aquela na qual o diagnóstico foi primeiramente estabelecido. Sendo escolhida a primeira biópsia em 12 casos, a segunda em 06 casos, a terceira em 05 casos, a quarta em 02 casos, a quinta em 01 caso e a sexta em 01 caso. Os três casos do ILSL não havia informação quanto à colocação da biópsia escolhida (Tabela 3).

A amostra dos pacientes com MF/SS foi composta por 18 homens e 12 mulheres, 23 brancos e 7 não brancos, com idade média de 56 anos ( $DP \pm 17$ ), variando de 21 a 79 anos. O tempo médio de doença ao diagnóstico (informação apenas dos pacientes da Unicamp) era de 6,6 anos ( $DP \pm 6,3$ ), variando de 8 meses a 23 anos (Tabela 3).

Quanto à distribuição dos casos em fase da doença, a amostra é constituída por 17 em fase de mancha eritematosa (16 casos da Unicamp e 01 caso da PUCCAMP), oito (08) em fase de placa (7 casos da Unicamp e 01 caso da PUCCAMP) e dois (02) casos de Síndrome de Sezary. Dos três casos do Instituto Lauro de Souza Lima não havia informações clínicas adequadas para estabelecimento da fase da doença no momento da biópsia, mas as características histopatológicas de dois deles (casos 28 e 29) são mais consistentes com fase de mancha eritematosa e em um (caso 30) já se observam microabscessos de Pautrier e atipias nucleares mais evidentes sugerindo fase de placa (Tabela 4).

O grupo controle é constituído por 11 pacientes da Unicamp com infiltrados linfóides cutâneos benignos. Estes foram selecionados entre pacientes que apresentavam suspeita clínica de linfoma cutâneo/micose fungóide e que, apesar da dificuldade diagnóstica diferencial, desenvolveram na evolução um curso benigno. Os diagnósticos finais destes casos foram: seis (06) casos de farmacodermia (dois com padrão de pseudolinfoma T secundário a droga), um (01) caso de infiltração linfocitária de Jessner, um (01) caso de neurodermite, um (01) caso de lúpus eritematoso, um (01) caso de pseudolinfoma e um (01) caso de eritema anular centrífugo (Tabela 5).

A amostra dos pacientes do grupo controle foi composta por 8 homens e 03 mulheres, 11 brancos, com idade média de 50 anos (DP  $\pm$  13), variando de 33 a 72 anos (Tabela 5).

**Tabela 3-** Informações clínicas dos casos de micose fungóide/ síndrome de Sézary

Paciente	Idade/Sexo	Biópsia escolhida	Anos/Nº de biópsias para Dx	Fase da MF
1.SRHS	21a/F	3º	2,5a/Duas	Placa
2.AS	24a/M	1º	2a/Uma	Mancha
3.BM	60a/M	3º	10a/Duas	Mancha
4.CP	49a/M	1º(suspeita)	23a/Duas (20 anos Dx Parapsoríase)	Placa
5.BAA	47a/F	2º(suspeita)	3a/Três	Mancha
6.VAF	79a/M	2º(suspeita)	3a/Três	Mancha
7.MAE	23a/F	1º	10a/Uma	Placa
8.ACO	72a/M	2º	1,5a/Duas	Sd de Sézary
9.IFS	54a/F	1º	2a/Uma	Mancha
10.CVE	73a/F	1º	2a/Uma	Mancha
11.CMS	69a/F	6º	12a/Seis	Mancha
12.SG	75a/M	3º	10a/Três	Mancha
13.AGP	73a/F	1º(suspeita)	15a/Três	Mancha
14.PRT	45a/M	3º	10a/Três	Placa
15.APS	65a/F	3º	1,5a/Três	Mancha
16.MB	69a/F	4º	1a/Duas	Mancha
17.OM	50a/M	1º	20a/Uma (bxs outros serviços)	Placa
18.EALS	54a/F	4º	13a/Duas	Placa
19.ILV	56a/M	2º (suspeita)	3a/Quatro	Mancha
20.ML	54a/M	5º	7a/Cinco	Mancha
21.LAG	34a/M	1º (suspeita)	8m/Duas	Mancha
22.NMC	32a/F	1º	1,5a/Uma	Mancha
23.JRS	50/M	1º	6a/Uma	Placa
24.JLDG	41a/M	2º	4a/Uma	Mancha
25.MZB	77a/F	1º	1a/Uma	Sd de Sézary
26.MVP	69a/M	2º	SI/Duas	Placa
27.OFS	69a/M	1º (suspeita)	SI/Três	Mancha
28.CC	67a/M	SI	SI	Mancha*
29.RR	62a/M	SI	SI	Mancha*
30.SP	66a/M	SI	SI	Placa*

SI- Sem informação; Dx- diagnóstico; bx – biópsia; \* Características histopatológicas; Anos/Nº de Bx para Dx: Tempo em anos e quantidade de biópsias realizadas antes do diagnóstico definitivo.



**Tabela 4-** Distribuição dos casos quanto à fase da Micose fungóide e casos de síndrome de Sézary

Nº de Casos	Fase da doença		
17	Mancha		
08	Placa		
02	Síndrome de Sézary		
03 (sem informações clínicas)	Aspectos Histopatológicos	Mancha - 02	Placa - 01

**Tabela 5-** Informações clínicas dos casos do grupo controle

Paciente	Idade/Sexo	Hipóteses clínicas	Diagnóstico
1.IEF	34a/F	Linfoma cutâneo;granuloma anular	Eritema anular centrífugo
2.DM	52a/M	Linfoma cutâneo	Neurodermite
3.AT	53a/M	Lúpus eritematoso Discóide; Farmacodermia; Linfoma cutâneo	Lúpus eritematoso discóide
4.SJS	54a/M	Micose Fungóide	Farmacodermia (clorana, paracetamol, AAS)
5.CB	72a/M	Linfocitoma cutis; micose fungóide	Infiltração linfocitária de Jessner
6.MPP	33a/F	Linfoma cutâneo; pseudolinfoma por medicamento	Farmacodermia padrão de pseudolinfoma (propranolol; propiltiouracil)
7.GG	71a/M	Micose Fungóide; farmacodermia; paraneoplásico	Farmacodermia padrão de pseudolinfoma (HCTZ; metildopa)
8.AA	49a/F	Micose fungóide	Farmacodermia (paracetamol; paracetamol+codeína)
9.NOS	51a/M	Farmacodermia; linfoma cutâneo	Farmacodermia (AAS)
10.OMM	41a/M	LE; farmacodermia/eritema polimorfo; linfoma cutâneo	Farmacodermia
11.JEC	41a/M	Linfoma cutâneo	Pseudolinfoma

## JUSTIFICATIVA

O estabelecimento do diagnóstico definitivo de MF é considerado extremamente difícil, principalmente em estágios iniciais, quando pode ser impossível a distinção com quadros inflamatórios (Ortonne et al., 2003). Isto ocorre tanto pela sobreposição com dermatoses benignas, quanto pela discordância entre os achados clínicos e histopatológicos. A busca por novos métodos que garantam critérios diagnósticos seguros de malignidade é de importância para nortear o tratamento e pode apresentar implicações prognósticas de valor inestimável.

Este estudo representa a continuidade de uma linha de pesquisa desenvolvida no nosso departamento com casos de infiltrados linfóides cutâneos, visando estabelecer aspectos histopatológicos, imunofenotípicos e, na presente pesquisa, morfométricos, que auxiliem no diagnóstico da MF. Trata-se de um trabalho inovador ao associar um método morfométrico à imunoistoquímica, realizados em preparados parafinados de rotina e analisados à microscopia óptica comum. Desta forma, pode adicionar critérios objetivos e aplicáveis na prática diária do patologista cirúrgico, para aumentar a acurácia do diagnóstico diferencial dos infiltrados linfóides cutâneos.



## **OBJETIVOS**

## **Objetivo geral**

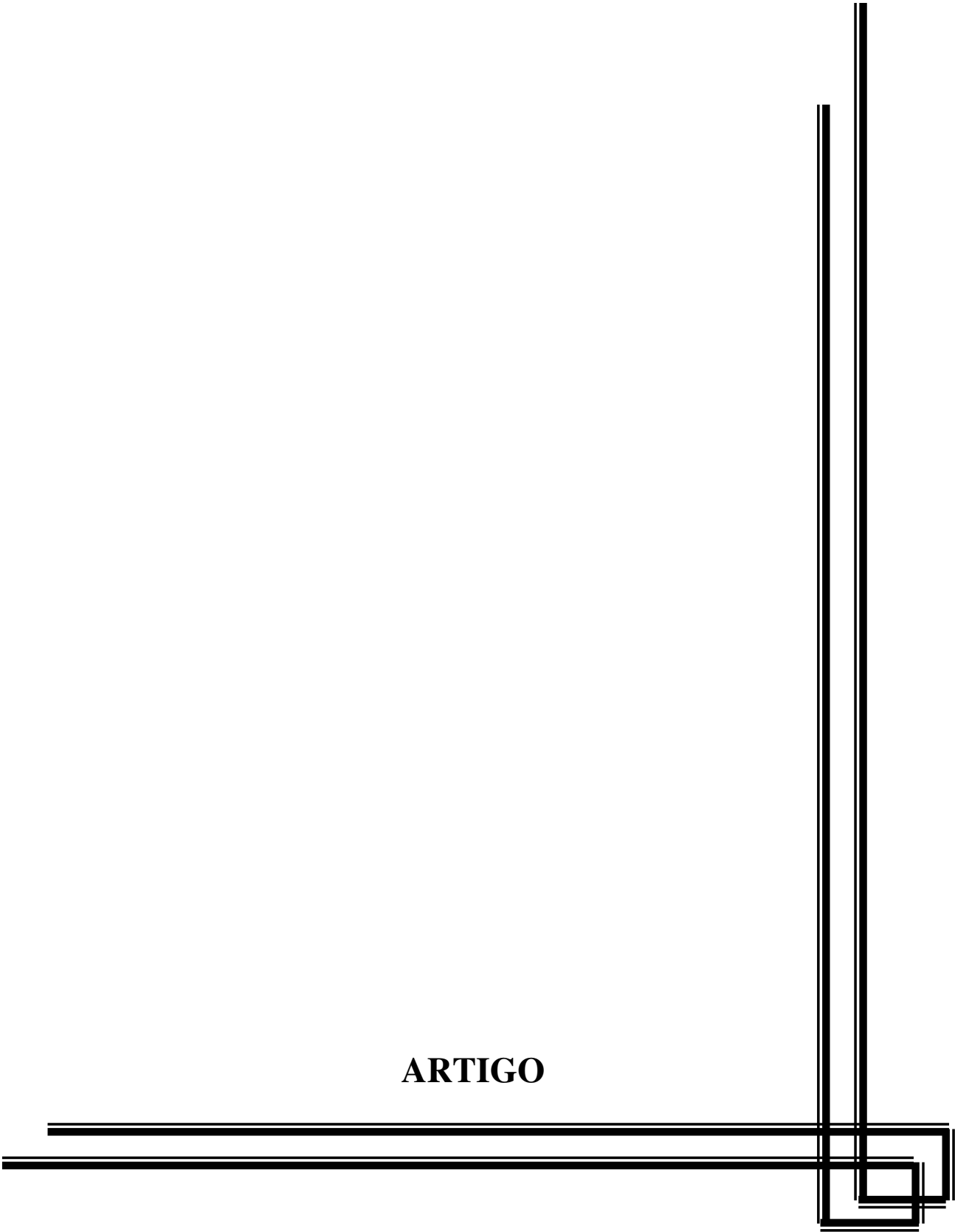
Estudar o valor diagnóstico de achados morfométricos e imunofenotípicos em pacientes portadores de infiltrações linfocitárias cutâneas.

## **Objetivos específicos**

Determinar o papel da avaliação morfométrica de linfócitos T CD3 positivos, detectados por imunohistoquímica, em fragmentos de pele, incluídos em parafina, na diferenciação das infiltrações linfocitárias cutâneas.

Determinar se há correlação entre o aumento da área nuclear e o percentual de imunexpressão do CD7 nas infiltrações linfocitárias cutâneas.

**ARTIGO**



# DIAGNOSTIC VALUE OF COMBINING IMMUNOSTAINING FOR CD3 AND NUCLEAR MORPHOMETRY IN MYCOSIS FUNGOIDES

Mariana Lira<sup>1</sup>, André Almeida Schenka<sup>2</sup>, Luis Alberto Magna<sup>3</sup>, Ana Cristina Cotta<sup>2</sup>, Maria Letícia Cintra<sup>4</sup>, Elemir Macedo de Souza<sup>5</sup>, Pierre Brousset<sup>6\*</sup>, José Vassallo<sup>6</sup>

From the Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas, Unicamp, Campinas, São Paulo, Brazil and (\*) Laboratory of Pathology, University of Toulouse, France.

- 1- Post-graduate fellow in Pathology; M. D.
- 2- Research assistant in Pathology; M. D.; Ph. D.
- 3- Professor of Genetics and Statistics; M. D.; Ph. D.
- 4- Associate Professor of Pathology; M. D.; Ph. D.
- 5- Associate Professor of Dermatology; M. D.; Ph. D.
- 6- Professor of Pathology; M. D.; Ph. D.

## **Address for correspondence:**

José Vassallo

Department of Anatomic Pathology, FCM, Unicamp

PO Box 6111; CEP 13083-970 – Campinas – SP – Brazil

Phone/Fax: +55-19-3289-3897

e-mail: [glaujv@fcm.unicamp.br](mailto:glaujv@fcm.unicamp.br)

Lira M, Schenka AA, Magna LA, Cotta AC, Cintra AL, Souza EM, Brousset P, Vassallo J. **Diagnostic Value of Combining Immunostaining for CD3 and Nuclear Morphometry in Mycosis Fungoides. J Clin Pathol 2008, 61: 209-212.**

## ABSTRACT

Mycosis fungoides (MF) represents the most common skin lymphoid neoplasm. In initial stages, differential diagnosis of MF with other benign dermal lymphoid infiltrates (BDLI) may be impossible on morphological basis alone. In previous studies by our group, only deletion of CD7 in MF proved to be of diagnostic help, but not the ratio between immunoexpression of CD4 and CD8. In the present study, 30 cases of MF and 11 cases of BDLI were analyzed, in order to compare morphometric parameters, which could be of diagnostic aid. As CD7 is frequently deleted in MF, immunohistochemical detection of T-cells was made using an antibody to CD3. Images of 100 positive cells per case in both groups were captured and analyzed using a simple computer program (Imagelab®) for nuclear perimeter (P), area (A), diameters (D) and nuclear contour index (NCI). All parameters showed statistically significant higher values for MF. Area was the variable with the strongest discriminating power between the two groups of patients. Even if morphologic evaluation is not accurate to distinguish benign *versus* malignant dermal lymphoid infiltrates, due to the variability of size and shape of these cells, a more sensitive method promptly shows this difference. Our results suggest that morphometry of CD3-positive lymphoid cells may add valuable information in the differential diagnosis of MF and benign dermatoses.

Running title: Morphometry in dermal T-lymphoid infiltrates.

Key words: Mycosis fungoides; Sézary syndrome; immunohistochemistry; CD3; morphometry.

## INTRODUCTION

Mycosis fungoides (MF) is the most common type of cutaneous T-cell lymphomas (CTCLs) and accounts for nearly 50% of primary lymphomas of the skin.[1] Histopathological and clinical diagnosis of the initial phases of MF may present overlap with benign dermal lymphoid infiltrates (BDLI). [2, 3] As consequence, low reproducibility of diagnosis based solely on morphology is the rule.

Immunophenotypically, MF typically is characterized by a proliferation of small to medium sized lymphocytes, with mature T-helper cell profile (CD3+, CD4+, CD8-). Irregularity of nuclear shape and cerebriform aspect has been regarded as helpful characteristics for the diagnosis of MF in semithin and ultrathin sections or in techniques combining electron microscopy and immunohistochemistry. [4-14] Nevertheless, these techniques cannot be easily adapted to the routine of diagnostic Pathology laboratories. Furthermore, because of the pleomorphism of lymphoid infiltrates, evaluation of size and shape of nuclei in routinely processed tissue specimens remain subjective and cannot be used as a criterion in the differential diagnosis between malignant and benign processes.

In previous studies by our group, we have demonstrated that deletion of CD7, a pan-T lymphoid marker, is a strong evidence for the diagnosis of MF.[15] On the other hand, we were not able to confirm the value of the ratio between the expression of CD4 and CD8 in predicting malignancy of dermal lymphoid infiltrates.[16] In addition to immunophenotyping, further feasible criteria would be desirable to aid in this diagnostic dilemma. This is especially true in cases with overlapping profiles, as in some instances CD7 may be expressed by neoplastic cells of MF in high numbers or it may be poorly expressed in benign dermatoses.[15] Despite the need for more accurate morphometric methods which could add relevant information in decision making, a practical approach has not yet been widely developed.[17,4]

In this context, we investigated the possible diagnostic role of nuclear morphometry of CD3+ lymphocytes present in routinely paraffin-embedded tissue samples of benign and malignant skin lymphocytic infiltrations.

## **METHODS**

### ***Patients***

A retrospective study was performed on 30 cases diagnosed as MF between 1989 and 2003 at the State University of Campinas (Unicamp, 25 cases), Pontifícia Universidade Católica de Campinas (Puccamp, 2 cases), Campinas, São Paulo, Brazil, and Instituto Lauro de Souza Lima (ILSL, 3 cases), Bauru, São Paulo, Brazil, corresponding to patients studied before.[15,16] Control group included 11 cases of BDLI: 6 cases of drug reactions, and one case each of Jessner's lymphocytic infiltration, neurodermatitis, lupus erythematosus, pseudolymphoma, and erythema annulare centrifugum. Diagnostic criteria for MF and for Sézary syndrome (SS) were those defined by the Cutaneous Lymphoma Study Group of the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC).[1] MF histopathologic diagnosis was performed according to clinical and histologic criteria for early patch, plaque, or late patches MF as well as its previously described variants. Cases were included after a follow-up of at least 48 months. Obvious malignant cutaneous high-grade non-Hodgkin lymphomas and patients who had primary nodal lymphomas in advanced stages, with clinically evident involvement of the skin were excluded, as well as those with evidence of extracutaneous disease 6 months after diagnosis, according to the EORTC criteria. In every case, paraffin embedded tissue blocks for histological evaluation, IHC and morphometric studies were available. The present study was approved by the Ethics Committee of the institutions.

### ***Immunohistochemistry***

Five- $\mu$ m-thick histologic sections were obtained from the paraffin-embedded tissue specimens, then deparaffinized in xylene, and rehydrated. The primary antibodies used were directed to CD3 (polyclonal, DakoCytomation/DAKO, Carpinteria, CA, USA, dilution 1:50) and to CD7 (CBC.37, Toulouse, France, dilution 1:20). A steamer was used for epitope retrieval and the EnVision polymer (DAKO) was used as the reaction amplifier. Reactions were performed with appropriate positive and negative controls. Staining was achieved with 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride (Sigma, St. Louis, MO) and counterstaining with Mayer's hematoxylin.

## ***Morphometry***

Image capture of CD3-positive cells was achieved with a video camera (Powershot G5, Canon) connected to a Zeiss-Axiophot bright field microscope, using a 40x objective. The number of captured microscopic fields depended on the number of lymphoid cells present in the preparations, varying from five to ten areas for each case, so that 100 cells could be analyzed. There was no selection of lymphoid cells with respect to nuclear size or shape.

Morphometric studies were carried out using a computerized image analysis system (Imagelab®, 2000). The following nuclear parameters were measured, all of them converted into  $\mu\text{m}$ : area (A), perimeter (P), maximal nuclear diameter ( $D_{\text{max}}$ ), minimum nuclear diameter ( $D_{\text{min}}$ ), and the nuclear contour index (NCI). This index is calculated by dividing nuclear perimeter by the square root of the nuclear area ( $\text{NCI} = P/\sqrt{A}$ ). NCI corresponds to a parameter to describe shape, independent of cell size, and represents an objective measurement of nuclear convolution; increasing nuclear indentation or convolution results in higher NCI values.[18]

## ***Statistical analysis***

For each parameter in both groups medians and mean values were calculated, as well as the standard deviation (SD). Comparison of these values between the groups of patients, MF and BDLI, was carried out using the parametric *t* Student test for independent samples. NCI constituted an exception, as its values did not show normal distribution; in this case the non-parametric Mann-Whitney test was used. Association between variables was analyzed by the Pearson correlation. For the analysis of correlation between positivity for CD7 (data shown by Cotta et al, 2006) [15] and nuclear area, the Spearman and Pearson tests were used. Statistic significance was set at  $p < 0.05$ . Specificity and sensibility of nuclear area for the diagnosis of MF were calculated, as this parameter showed the best discriminatory power.



## RESULTS

All morphometric parameters analyzed showed statistically significant higher mean values in MF than in BDLI ( $p < 0.001$ ; Table 1, Figures 1 and 2). Association between variables applying Pearson's correlation evidenced the highest correlation rate ( $r = 0.899$ ) in nuclear area and the lowest rate ( $r = 0.778$ ) in NCI. Nuclear area showed the best discriminatory power among all parameters, with 99.08% specificity and 99.54% sensitivity. There was a tendency to a correlation between the loss of expression of CD7 and increase in nuclear area ( $r = -0.136$  using the Pearson test and  $-0.35$  using the Spearman test), but this inverse correlation did not reach statistical significance ( $p = 0.39$  and  $0.82$ , respectively).

## DISCUSSION

Morphometry represents a powerful tool to minimize some of the subjective aspects of histopathological analysis. Subtle variations in size, shape and texture of cells may be detected by quantitative parameters, which, when applied in diagnostic pitfalls, allow greater reproducibility.[19-23] Morphometric evaluation of nuclear characteristics is of special interest, as it may also correlate with tumour differentiation and, sometimes, with the neoplasm's aggressiveness.[24]

Dislike the lymph node, where the morphologic diagnosis of lymphoma relies also on architectural aspects in most cases, in dermal infiltrates the morphology of individual lymphoid cells is a crucial factor. All morphometric parameters used in the present study revealed significant higher values in MF, supporting this method as an additional practical approach in differentiating the nature of dermal lymphoid infiltrates. As such, combination of routinely processed specimens with immunostaining for CD3 enhances the objectivity of analysis, as other mononuclear cells are not included in the calculations.

Characterization of irregularities in size and shape of lymphoid cell nuclei has been addressed in the literature in the differential diagnosis between reactive dermal infiltrates and MF/SS. An objective parameter is represented by the nuclear contour index

(NCI) first described by Schrek in cases of chronic lymphoid leukaemia.[18] This index corresponds to  $3,54 (2/\sqrt{\pi})$  in a regular circle and increases in value proportionally to the intensification of the nuclear indentations and convolutions. Since the application of this index in the designation of the cerebriform nuclei in SS by Livovitz and Lutzner, a number of studies have tested its role in the differential diagnosis of dermal lymphoid infiltrates.[25] Shum et al, McNutt et al, Meijer et al and van der Loo et al have demonstrated the usefulness of NCI in the differential diagnosis between benign dermatosis and MF using electron microscopy.[5,9,10,11] Our data support these findings, though in our study this index was the least powerful in discriminating the two groups of infiltrates. This could be due to the lower resolution of optical microscopy in demonstrating nuclear irregularities as compared to ultramicroscopy.

The usefulness of determining the nuclear area of lymphocytes was subsequently demonstrated by Lessana-leibowitch et al,[4] using ultrathin sections of epoxy embedded tissue, and by Sinha et al and Riegger et al using paraffin embedded specimens.[26,17] In our study this was the most important discriminating parameter, with 99.08% specificity and 99.54% sensibility. Maximum diameter was also significantly different between benign dermatosis and MF (media  $4.98\mu\text{m}$  versus  $6.54\mu\text{m}$ ), supporting the findings by Riegger et al and Santucci et al.[17,27]

Other authors have used combinations of morphology and immunostaining, mostly by electron microscopy, in order to achieve better morphological details or to ensure that the cells analyzed corresponded to T-lymphocytes.[12-14] Although important for scientific purposes, the use of ultramicroscopy and immunoelectron microscopy is by no means feasible in diagnostic routine. In opposition, a reliable morphology can be used in combination with immunohistochemistry on routinely processed tissues, and analyzed by the pathologist using a simple image capture and analysis system, as shown by us.

In our previous study where we analysed loss of expression of CD7 in MF as opposed to BDLI, we had hypothesised that larger atypical cells of malignant infiltrates were more likely to lose CD7.[15] In the present analysis, although there was a tendency of correlation between the loss of CD7 and increase of nuclear area, this was not statistically

significant. Although this may represent insufficient number of cases analysed, it can also argue in favour of the complementarity of both methods in an individual case.

Our results supports the notion that a simple and feasible method of morphometric analysis of suspicious CD3-positive lymphoid cells, such as the one presented herein, may achieve high accuracy in the differential diagnosis between MF and benign dermatoses.

## REFERENCES

1. Willemze R, Jaffe ES, Burg G, Cerroni L, Berti E, Swerdlow SH, et al. WHO-EORTC classification for cutaneous lymphomas. *Blood* 2005; **105**: 3768-3785.
2. Zackheim HS & McCalmont TH. Mycosis fungoides: The great imitator. *J Am Acad Dermatol* 2002; **47**: 914-918.
3. Cerroni L. Lymphoproliferative lesions of the skin. *J Clin Pathol* 2006; **59**: 813-826.
4. Lessana-Leibowitch M, Prado A, Palangie A, Lamy F, Flandrin G. The diagnosis of cutaneous T-cell lymphoma by morphometric evaluation of the cellular infiltrate, using semithin sections. *Br J Dermatol* 1984; **110**: 511-521.
5. Shum DT, Roberts JT, Smout MS, Wells GA, Simon GT. The value of nuclear contour index in the diagnosis of mycosis fungoides. *Cancer* 1986; **57**: 298-304.
6. Crocker J. Morphometric and related quantitative techniques in the study of lymphoid neoplasm. A review. *J Pathol* 1984; **143**: 69-80.
7. Eng AM, Blekys I, Worobec SM. Clinicopathologic correlations in Alibert-type mycosis fungoides. *Arch Dermatol* 1981; **117**: 332-337.
8. McNutt NS & Crain WR. Quantitative electron microscopic comparison of lymphocyte nuclear contours in mycosis fungoides and in benign infiltrates in skin. *Cancer* 1981; **47**: 698-709.
9. McNutt NS, Heilbron DC, Crain WR. Mycosis fungoides: diagnostic criteria based on quantitative electron microscopy. *Lab Invest* 1981; **44**: 466-474.
10. Meijer CJLM, van der Loo EM, van Vloten WA, van der Velde EA, Scheffer E, Cornelisse CJ. Early diagnosis of mycosis fungoides and Sesary's syndrome by morphometric analysis lymphoid cells in the skin. *Cancer* 1980; **45**: 2864-2871.

11. van der Loo EM, van Vloten WA, Cornelisse CJ, Scheffer E, Meijer CJLM. Relevance of morphometry in the differential diagnosis of cutaneous T cell lymphomas. *Br J Dermatol* 1981; **104**: 257-269.
12. Payne CM, Grogan TM, Lynch PJ. An ultrastructural morphometric and immunohistochemical analysis of cutaneous lymphomas and benign lymphocytic infiltrates of the skin. Useful criteria for diagnosis. *Arch Dermatol* 1986; **122**: 1139-1154.
13. Iwahara K & Hashimoto K. T-cell subsets and nuclear contour index of the skin-infiltrating T-cell cutaneous lymphoma. *Cancer* 1984; **54**: 440-446.
14. Hashimoto K & Iwahara K. Immunoelectron microscopy related to T-cell monoclonal surface antigen in mycosis fungoides. *Am J Dermatopathol* 1983; **5**: 129-134.
15. Cotta AC, Cintra ML, Souza EM, Chagas CA, Fleury RN, Brousset P, Magna LA, Vassallo J. Diagnosis of mycosis fungoides: a comparative immunohistochemical study of T-cell markers using a novel anti-CD7 antibody. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2006; **14**: 291-295.
16. Cotta AC, Cintra ML, Souza EM, Magna LA, Vassallo J. Reassessment of diagnostic criteria in cutaneous lymphocytic infiltrates. *Sao Paulo Med J* 2004; **122**: 161-165.
17. Rieger E, Smolle J, Hoedl S, Juettner F-M, Kerl H. Morphometrical analysis of mycosis fungoides on paraffin-embedded sections. *J Cutan Pathol* 1989; **16**: 7-13.
18. Schrek R Ultrastructure of the blood lymphocytes from chronic lymphocytic and lymphosarcoma cell leukemia. *J Natl Cancer Inst* 1972; **48**: 51-64.
19. Sokol RJ, Hudson G, Wales J, James NT. Ultrastructural morphometry of human leucocytes in health and disease. *Electron Microsc Rev* 1991; **4**: 179-195.
20. Lim CN, Ho BC, Bay BH, Yip G, Tan PH. Nuclear morphometry in columnar cell lesions of the breast: is it useful. *J Clin Pathol* 2006; **59**: 1283-1286.

21. Kirillov VA, Yuschenko YP, Paplevka AA, Demidchick EP. Thyroid diagnosis based on a set of karyometric parameters of follicular cells. *Cancer* 2001, **92**:1818-1827.
22. Baak JP, ten Kate FJ, Offerhaus GJ, van Lanschot JJ, Meijer GA. Routine morphometrical analysis can improve reproducibility of dysplasia grade in Barrett's oesophagus surveillance biopsies. *J Clin Pathol* 2002, **55**: 910-916.
23. Hsu CY, Kurman RJ, Vang R, Wang TL, Baak J, Shih IeM. Nuclear size distinguishes low from High grade ovarian serous carcinoma and predicts outcome. *Hum Pathol* 2005, **36**: 1049-1054.
24. Payne CM and Glasser L. Ultrastructural morphometry in the diagnosis of Sézary syndrome. *Arch Pathol Lab Med* 1990; **114**: 661-671.
25. Litovitz TL and Lutzner MA. Quantitative measurements of blood lymphocytes from patients with chronic lymphocytic leukemia and Sesary's syndrome. *J Natl Cancer Inst* 1974; **53**: 75-77.
26. Sinha AK, Singh MK, Dinda AK, Ramam M. morphometric study of lymphoid cells in mycosis fungoides and its simulators. *Indian J Pathol Microbiol* 2003; **46**: 28-33.
27. Santucci M, Biggeri A, Feller AC, Massi D, Burg G. Efficacy of histologic Criteria for Diagnosing early mycosis fungoides. *Am J Surg Pathol* 2000; **24**: 40-50.

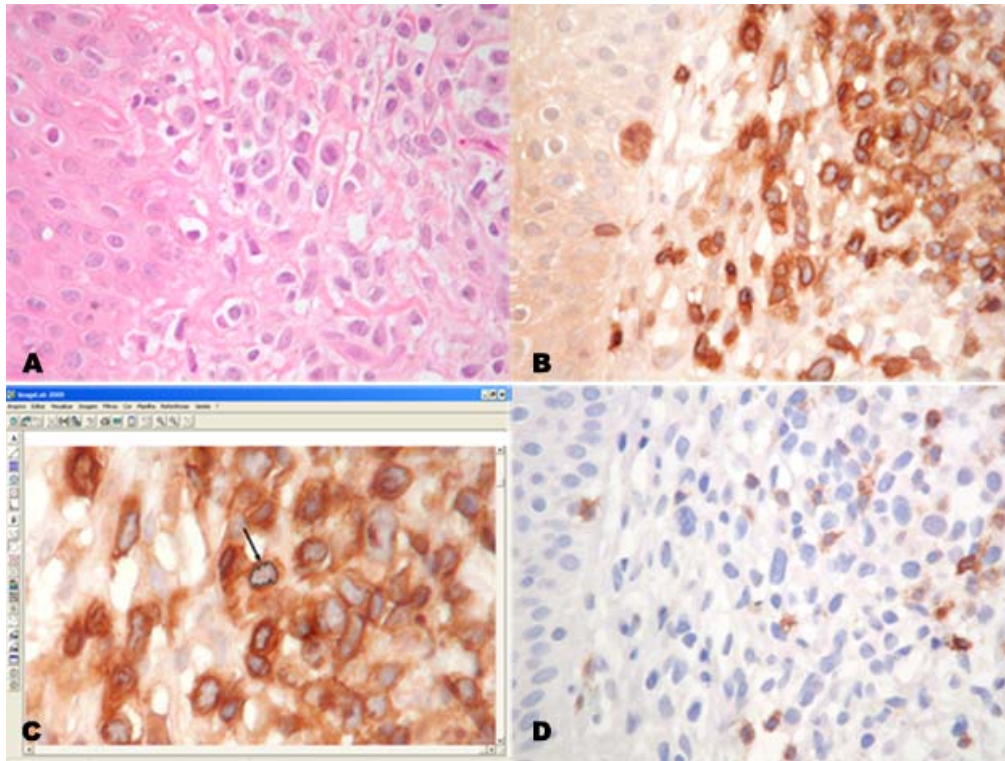
**Table 1:** Morphometric parameters in mycosis fungoides (MF: n= 30) and benign dermal lymphoid infiltrates (BDLI: n= 11).

	<b>A (<math>\mu\text{m}^2</math>)</b>	<b>P (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>D<sub>max</sub> (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>D<sub>min</sub> (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>NCI</b>
<b>MF</b>					
<i>Median</i>	22.48	21.22	6.52	4.67	4.52
<i>Mean</i>	22.63	21.41	6.54	4.73	4.53
<i>SD</i>	1.98	1.40	0.36	0.25	0.13
<i>Range</i>	19,88-26,87	19,57-24,57	5,91-7,28	4,36-5,19	4,32-4,80
<b>BDLI</b>					
<i>Median</i>	14.20	15.72	4.88	3.79	4.18
<i>Mean</i>	14.31	15.75	4.98	3.86	4.19
<i>SD</i>	1.34	0.97	0.40	0.25	0.10
<i>Range</i>	12,36-16,62	14,49-17,88	4,47-5,60	3,44-4,25	4,08-4,45

**Abbreviations:** A: nuclear area; P: nuclear perimeter; D<sub>max</sub>: maximum diameter; D<sub>min</sub>: minimum diameter; NCI: nuclear contour index.

All parameters: p < 0.001

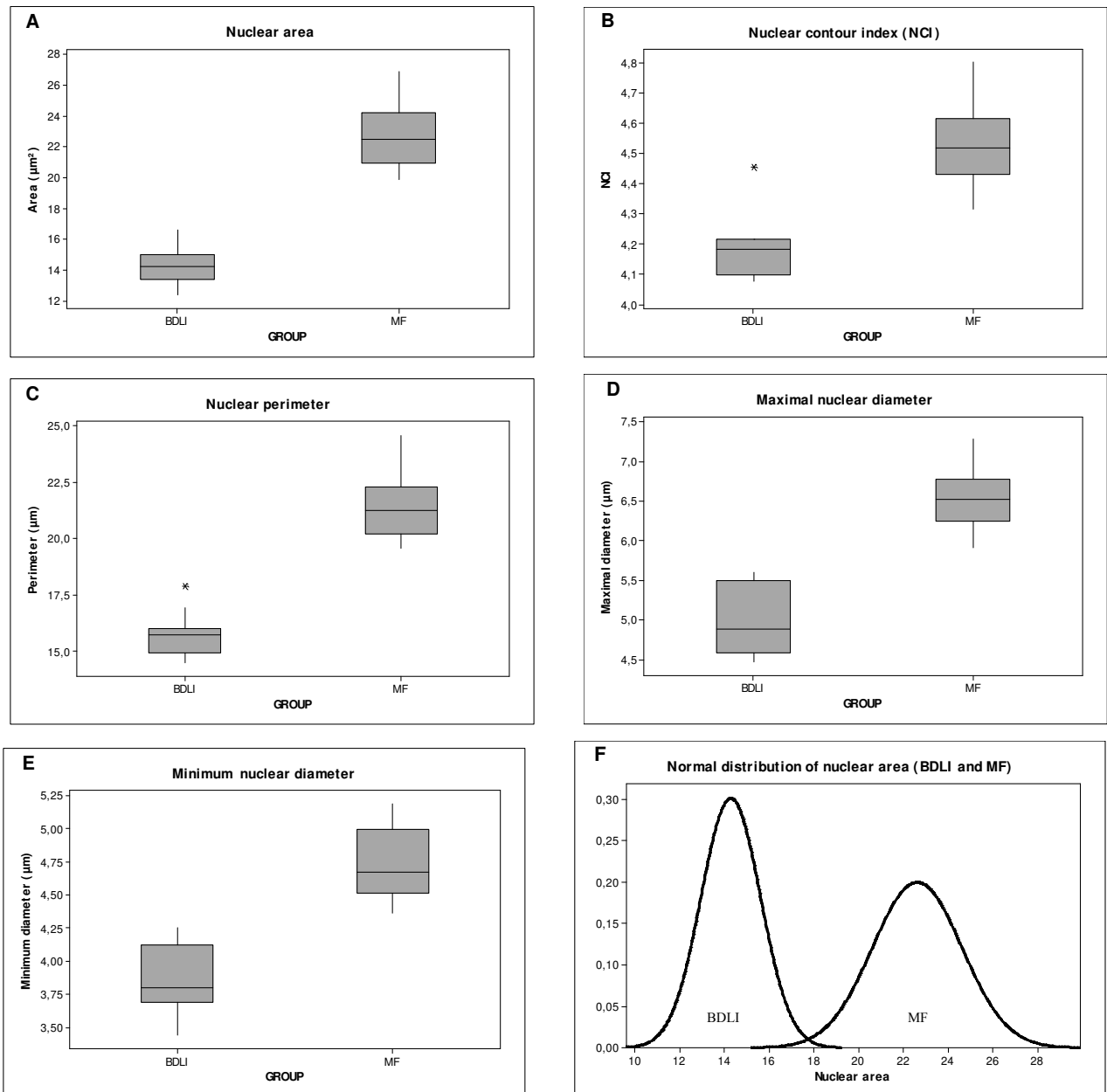
**Figure 1**



**A**= Atypical cells of mycosis fungoides infiltrating upper dermis and permeating the epidermis (haematoxylin & eosin, 400x). **B**= Immunostaining for CD3 showing diffuse positivity in neoplastic cells (anti-CD3, 400x). **C**= Same picture shown in B, included in the program Imagelab for morphometric analysis; note one of the nuclei with contour delineated for calculation of parameters (arrow). **D**= In the same case, CD7 was expressed only in reactive infiltrating T-lymphocytes, but not in neoplastic cells (anti-CD7, 400x).



**Figure 2**



Box plots showing values of the nuclear area (A), NCI (B), nuclear perimeter (C), maximal nuclear diameter (D) and minimum nuclear diameter (E) in benign dermal lymphoid infiltrates (BDLI) and mycosis fungoides (MF). F: Normal distribution of nuclear area in BDLI (left curve) and MF (right curve).

## DISCUSSÃO

O diagnóstico diferencial das infiltrações linfocitárias da pele representa um dos mais difíceis problemas da patologia cirúrgica. Há um grande número de entidades clínicas que se caracterizam histologicamente pelo aumento da população linfóide na pele, sendo de essencial importância a distinção entre os grupos de pacientes que serão submetidos a abordagens terapêuticas completamente diferentes. A caracterização de uma infiltração linfocitária como de índole benigna implica em terapêutica menos agressiva, apenas observação periódica ou até alta clínica (Burg et al., 1995). Um diagnóstico histológico de malignidade ou passível de evolução maligna, por outro lado, conduz a uma abordagem terapêutica mais agressiva desde o início, incluindo acompanhamento clínico mais freqüente, aplicação de corticosteróides, bexaroteno (retinóide sintético), agentes quimioterápicos tópicos (mostarda nitrogenada e carmustine), fototerapia, Psoralen-ultravioleta A (PUVA), banho de elétrons e, em estágios mais avançados, *Denileukin diftitox* (combinação de toxina difitérica com um pepídeo recombinante da IL-2) e quimioterapia sistêmica (Apisarnthanarax et al., 2002).

Não há, atualmente, consenso na literatura sobre o valor independente das características imunoistoquímicas para o diagnóstico de malignidade, em proliferações linfocitárias da pele. Em estudos prévios realizados neste material pelo nosso grupo não confirmamos os achados de alguns autores (Izban et al., 1998; Nuckolsa et al., 1999; Florell et al, 2006), que enfatizavam a importância da relação entre a expressão de CD4 e CD8 pelas células linfóides no diagnóstico diferencial entre dermatoses e linfomas T cutâneos (Cotta et al, 2004). Entretanto, tivemos a oportunidade de comprovar a utilidade da deleção do marcador linfóide T, o CD7, nas lesões linfomatosas. Neste último estudo, ficou-nos a impressão de que a perda da expressão do CD7 era mais evidente em células linfóides mais volumosas e atípicas (Cotta et al, 2006).

Diante deste achado surgiu a hipótese da ocorrência de uma correlação entre a perda de expressão do CD7 e o aumento da área nuclear das células neoplásicas na MF. Na presente análise, embora tenha sido evidenciada uma tendência de correlação, esta não foi estatisticamente significativa. Este fato pode ser decorrente de um número insuficiente de casos, mas por outro lado sinaliza a favor de complementaridade dos métodos que podem ser aplicados em casos individuais de dificuldade diagnóstica.

A ausência de critérios de malignidade seguros e a ocorrência de variações morfológicas sutis entre dermatoses inflamatórias e MF são responsáveis pela baixa reprodutibilidade no diagnóstico definitivo dos infiltrados linfóides cutâneos. Trabalhos realizados por patologistas especialistas demonstram baixa acurácia diagnóstica (Olerud et al., 1992; Burg et al., 1994; Santucci et al., 2000). Diminuir a subjetividade dos critérios aplicados é extremamente útil neste diagnóstico diferencial. E assim, a morfometria representa uma estratégia poderosa para obtenção de dados objetivos e reproduzíveis.

Os estudos morfométricos anteriores demonstram que a utilização de parâmetros como índice de contorno nuclear (ICN), área, perímetro e diâmetros nucleares podem ser úteis para o diagnóstico de micose fungóide. No entanto, a maioria destes estudos são ultraestruturais (Meijer et al., 1980; van der Loo et al., 1981; McNutt e Crain, 1981; Shum et al., 1986; Payne et al., 1986) ou usando tecidos incluídos em resina para cortes especiais (Lessana-Leibowitch et al., 1984), mas não aplicam as técnicas rotineiras de um laboratório de Anatomia Patológica. A análise morfométrica em células previamente identificadas como linfócitos de linhagem T é extremamente interessante por minimizar o problema de mensuração de células não linfóides, mas também só foi em realizada em trabalhos com imunoelétrica (Iwahara e Hashimoto, 1983; Iwahara e Hashimoto, 1984). Apesar de importantes do ponto de vista científico, a utilização de microscopia eletrônica e microscopia imunoelétrica não são viáveis no diagnóstico de rotina.

O presente estudo evidenciou uma diferença estatisticamente significativa de todos os parâmetros morfométricos analisados (ICN, área, perímetro e diâmetros nucleares mínimo e máximo) entre os casos de MF e dermatoses benignas, corroborando os achados previamente descritos na literatura (Meijer et al., 1980; van der Loo et al., 1981; McNutt e Crain, 1981; Lessana-Leibowitch et al., 1984; Iwahara & Hashimoto, 1984; Shum et al., 1986; Payne et al., 1986; Rieger et al., 1989; Sinha et al., 2003; Gamsizkan et al., 2007). Através da aplicação da curva ROC (Receiver operating characteristic curves), foram estabelecidos os valores de corte das médias de cada variável morfométrica, capazes de separar entre os dois grupos. O valor de corte determinado para a área foi  $18,25 \mu\text{m}^2$ , para o perímetro  $18,75 \mu\text{m}$ , para o ICN 4,25, para o diâmetro máximo

5,75  $\mu\text{m}$  e para o diâmetro mínimo 4,35  $\mu\text{m}$ . Portanto, na amostra estudada, todos os casos com médias acima destes valores fazem parte do grupo MF/SS. E abaixo destes valores só há casos do grupo de infiltrados linfóides benignos (Anexo 5).

Não houve diferença estatisticamente significativa entre as variáveis morfométricas e as fases da MF. Possivelmente, o número de casos de cada fase (19 mancha eritematosa e nove placa) não foi suficiente para esta avaliação. Alternativamente, esta diferença pode não ser propriamente significativa e se estabelecer apenas quando houver evolução para fase tumoral ou transformação para linfoma agressivo (Anexo 6).

O presente trabalho demonstrou, assim, que a associação da morfometria com a imunohistoquímica em material de rotina apresenta elevadas sensibilidade e especificidade no diagnóstico dos infiltrados linfóides cutâneos. Além disto, dispensa cortes histológicos especiais (semi-finos e ultra-finos) e é um método mais barato e mais prático que a microscopia imunoeletrônica.

É possível considerar a utilização deste método na rotina, particularmente em casos de infiltrados linfóides cutâneos duvidosos, sem resposta terapêutica, com múltiplas biópsias e sem definição diagnóstica. Embora o estudo tenha requerido um trabalho minucioso de seleção dos núcleos, que demorou em média três horas por caso, talvez seja viável realizá-lo através de uma seleção programada. Esta seria feita pelo estabelecimento prévio da coloração das células a serem mensuradas, e estas seriam automaticamente selecionadas pelo programa, provavelmente necessitando menos tempo para sua realização.

Além disso, os avanços dos programas de análise de imagem trazem modelos cada vez mais simples e práticos (Atalag et al., 2004). Este fato aliado à busca crescente por dados objetivos e mais precisos torna-os um importante instrumento auxiliar para o patologista cirúrgico.

Apesar dos avanços, o tema do diagnóstico diferencial dos infiltrados linfóides cutâneos está longe de ser esgotado. Pretendemos realizar a validação deste estudo em outras amostras de casos de MF, visando confirmar os presentes achados e assim,

estabelecer com maior precisão a aplicação do método. Diante das evidências descritas da participação de defeitos da apoptose na patogênese da micose fungóide (Dereure et al., 2000; Zhang et al., 2002), elaboramos também um projeto para avaliação de moléculas pró e anti-apoptóticas neste material, a fim de determinar a possível aplicação destas na definição de malignidade dos infiltrados linfóides cutâneos.

## CONCLUSÃO

A avaliação de parâmetros nucleares de células previamente identificadas como linfócitos T permitiu a diferenciação morfométrica entre MF e infiltrações linfocitárias benignas no presente estudo. Este método pode adicionar critérios objetivos, práticos e menos onerosos, para auxiliar no diagnóstico da MF.

Houve uma tendência de correlação entre a perda de expressão do CD7 e o aumento da área nuclear, sugerindo complementaridade entre as duas abordagens no diagnóstico diferencial dos infiltrados linfóides cutâneos.



## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Al Saati T, Alibaud L, Lamant L, Boyes J, March M, Delsol G. A new monoclonal anti-CD7 antibody reactive on paraffin sections. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2001; 9:289-96.

Apisarnthanarax N, Talpur R, Duvic M. Treatment of cutaneous T-cell lymphoma. Current status and future directions. *Am J Clin Dermatol* 2002; 3: 193-215.

Atalag K, Sincan M, Celasun B, Karaagaoglu E. Effects of lossy image compression on quantitative image analysis of the cell nuclei. *Analyt Quant Cytol Histol* 2004; 26: 22-27.

Baak JP, ten Kate FJ, Offerhaus GJ, van Lanschot JJ, Meijer GA. Routine morphometrical analysis can improve reproducibility of dysplasia grade in Barrett's oesophagus surveillance biopsies. *J Clin Pathol* 2002; 55: 910-916.

Burg G, Zwingers T, Staegmeir E, Santucci M for the EORTC-cutaneous lymphoma project group. Interrater and intrarater variabilities in the evaluation of cutaneous lymphoproliferative T-cell infiltrates. *Dermatol Clin* 1994; 12: 311-314.

Burg G, Dummer R, Dommann S, Nestle F, Nickoloff B. Pathology of cutaneous T-cell lymphoma. *Hematol Oncol Clin North Am* 1995; 9:961-995.

Cerroni L. Lymphoproliferative lesions of the skin. *J Clin Pathol* 2006; 59: 813-826.

Cotta AC, Cintra ML, Souza EM, Chagas CA, Fleury RN, Brousset P, Magna LA, Vassallo J. Diagnosis of mycosis fungoides: a comparative immunohistochemical study of T-cell markers using a novel anti-CD7 antibody. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2006; 14: 291-295.

Cotta AC, Cintra ML, Souza EM, Magna LA, Vassallo J. Reassessment of diagnostic criteria in cutaneous lymphocytic infiltrates. *Sao Paulo Med J* 2004; 122: 161-165.

Crocker J. Morphometric and related quantitative techniques in the study of lymphoid neoplasm. A review. *J Pathol* 1984; 143: 69-80.

Dereure, O, Portales P, Clot J, Guilhou J-J. Decreased expression of Fas (APO-1/CD95) on peripheral blood CD4+ T lymphocytes in cutaneous T-cell lymphomas. *Br J Dermatol* 2000; 143: 1205-1210.

Eng AM, Blekys I, Worobec SM. Clinicopathologic correlations in Alibert-type mycosis fungoides. *Arch Dermatol* 1981; 117: 332-337.

Florell SR, Cessna M, Lundell RB, Boucher KM, Bowen GM, Harris RM, Petersen MJ et al. Usefulness (or lack thereof) of immunophenotyping in atypical cutaneous T-cell infiltrates. *Am J Clin Pathol* 2006; 125: 727-736.

Gamsizkan M, Demiriz M, Karslioglu Y, Günhan O. Comparative morphometric analysis of intraepidermal and dermal lymphocytes in early mycosis fungoides and some inflammatory dermatoses. *Anal Quant Cytol Histol* 2007; 29: 153-158.

Girardi M, Heald PW, Wilson LD. The pathogenesis of mycosis fungoides. *N Engl J Med* 2004; 350:1978-1988.

Glusac EJ. Criterion by criterion, mycosis fungoides. *Am J Dermatopathol* 2003; 25: 264-9.

Glusac EJ. Of cells and architecture: new approaches to old criteria in mycosis fungoides. *J Cutan Pathol* 2001; 28: 169-173.

Haeffner AC, Smoller BR, Zepter K, Wood GS. Differentiation and clonality of lesional lymphocytes in small plaque parapsoriasis. *Arch Dermatol* 1995; 131: 321-4.

Hashimoto K & Iwahara K. Immunoelectron microscopy related to T-cell monoclonal surface antigen in mycosis fungoides. *Am J Dermatopathol* 1983; 5: 129-134.

Hsu CY, Kurman RJ, Vang R, Wang TL, Baak J, Shih IeM. Nuclear size distinguishes low from High grade ovarian serous carcinoma and predicts outcome. *Hum Pathol* 2005; 36: 1049-1054.

Iwahara K & Hashimoto K. T-cell subsets and nuclear contour index of the skin-infiltrating T-cell cutaneous lymphoma. *Cancer* 1984; 54: 440-446.

Izban KF, Hsi ED, Alkan S. Immunohistochemical analysis of mycosis fungoides on paraffin-embedded tissue sections. *Mod Pathol* 1998; 11: 978-82.

Kempf W, Dummer R, Burg G. Approach to lymphoproliferative infiltrates of the skin. The difficult lesions. *Am J Clin Pathol* 1999; 111 (Suppl.1): S84-S93.

Kim YH, Hoppe RT. Mycosis fungoides and the Sezary syndrome. *Semin Oncol* 1999; 26:276-89.

Kirillov VA, Yuschenko YP, Paplevka AA, Demidchick EP. Thyroid diagnosis based on a set of karyometric parameters of follicular cells. *Cancer* 2001, 92:1818-1827.

Koh HK, Charif M, Weinstock MA. Epidemiology and clinical manifestations of cutaneous T-cell lymphoma. *Hematol Oncol Clin North Am* 1995;9: 943-60.

Kummer JA, Vermeer MH, Dukers D, Meijer CJ, Willemze R. Most primary cutaneous CD30-positive lymphoproliferative disorders have a CD4-positive cytotoxic T-cell phenotype; *J Invest Dermatol* 1997; 109: 636-40.

Lessana-Leibowitch M, Prado A, Palangie A, Lamy F, Flandrin G. The diagnosis of cutaneous T-cell lymphoma by morphometric evaluation of the cellular infiltrate, using semithin sections. *Br J Dermatol* 1984; 110: 511-521.

Lim CN, Ho BC, Bay BH, Yip G, Tan PH. Nuclear morphometry in columnar cell lesions of the breast: is it useful. *J Clin Pathol* 2006; 59: 1283-1286.

Lira M, Schenka AA, Magna LA, Cotta AC, Cintra AL, Souza EM, Brousset P, Vassallo J. Diagnostic Value of Combining Immunostaining for CD3 and Nuclear Morphometry in Mycosis Fungoides. *J Clin Pathol* 2008, 61: 209-212.

Litovitz TL and Lutzner MA. Quantitative measurements of blood lymphocytes from patients with chronic lymphocytic leukemia and Sezary's syndrome. *J Natl Cancer Inst* 1974; 53: 75-77.

Liu V e McKee PH. Cutaneous T-cell lymphoproliferative disorders: approach for the surgical pathologist: recent advances and clarification of confused issues. *Adv Anat Pathol* 2002; 9: 79-100.

McNutt NS & Crain WR. Quantitative electron microscopic comparison of lymphocyte nuclear contours in mycosis fungoides and in benign infiltrates in skin. *Cancer* 1981; 47: 698-709.

McNutt NS, Heilbron DC, Crain WR. Mycosis fungoides: diagnostic criteria based on quantitative electron microscopy. *Lab Invest* 1981; 44: 466-474.

Meijer CJLM, van der Loo EM, van Vloten WA, van der Velde EA, Scheffer E, Cornelisse CJ. Early diagnosis of mycosis fungoides and Sezary's syndrome by morphometric analysis lymphoid cells in the skin. *Cancer* 1980; 45: 2864-2871.

Michie SA, Abel EA, Hoppe RT, Warnke RA, Wood GS. Discordant expression of antigens between intraepidermal and intradermal T cells in mycosis fungoides. *Am J Pathol* 1990; 137: 1447-1451.

Ming M e LeBoit PE. Can dermatopathologists reliably make the diagnosis of mycosis fungoides, If not, who can? *Arch Dermatol* 2000; 136: 543-546.

Montironi R, Filho-Longatto A, Santinelli A, Mazzucchelli R, Pomante R, Colanzi P, Scarpelli M. Nuclear changes in the normal-looking columnar epithelium adjacent to and distant from prostatic intraepithelial neoplasia an prostate cancer. Morphometric analysis in whole-mount sections. *Virchows Arch* 2000; 437: 625-634.

Murphy M, Fullen D, Carlson JA. Low CD7 expression in benign and malignant cutaneous lymphocytic infiltrates: experience with an antibody reactive with paraffin-embedded tissue. *Am J Dermatopathol* 2002; 24: 6-16.

Nuckols JD, Shea CR, Horenstein MG, Burchette JL, Prieto VG. Quantitation of intraepidermal T-cell subsets in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue helps in the diagnosis of mycosis fungoides. *J Cutan Pathol.* 1999; 26: 169-75.

Olerud JE, Kulin PA, Chew DE. Cutaneous T-cell lymphomas: evaluation of pretreatment skin biopsy specimens by a panel of pathologists. *Arch Dermatol* 1992; 128: 501-507.

Ormsby A, Bergfeld WF, Tubbs RR, Hsi ED. Evaluation of a new paraffin-reactive CD7 T-cell deletion marker and a polymerase chain reaction-based T-cell receptor gene rearrangement assay: implications for diagnosis of mycosis fungoides in community clinical practice. *J Am Acad Dermatol* 2001; 45: 405-13.

Payne CM, Nagle RB, Lynch PJ. Quantitative electron microscopy in the diagnosis of mycosis fungoides. A simple analysis of lymphocytic nuclear convolutions. *Arch Dermatol,* 1984; 120: 63-75.

Payne CM, Grogan TM, Lynch PJ. An ultrastructural morphometric and immunohistochemical analysis of cutaneous lymphomas and benign lymphocytic infiltrates of the skin. Useful criteria for diagnosis. *Arch Dermatol* 1986; 122: 1139-1154.

Payne CM and Glasser L. Ultrastructural morphometry in the diagnosis of Sézary syndrome. *Arch Pathol Lab Med* 1990; 114: 661-671.

Pimpinelli N, Olsen EA, Santucci M, Vonderheid E, Haeffner AC, Stevens S, et al. Defining early mycosis fungoides. *J Am Acad Dermatol* 2005; 53: 1053-63.

Ponti R, Quaglino P, Novelli M, Fierro MT, Comessatti A, Peroni A, et al. T-cell receptor gamma gene rearrangement by multiplex polymerase chain reaction/heteroduplex analysis in patients with cutaneous T-cell lymphoma (mycosis fungoides/Sezary syndrome) and benign inflammatory disease: correlation with clinical, histological and immunophenotypical findings. *Br J Dermatol* 2005; 153: 565-73.

Rieger E, Smolle J, Hoedl S, Juettner F-M, Kerl H. Morphometrical analysis of mycosis fungoides on paraffin-embedded sections. *J Cutan Pathol* 1989; 16: 7-13.

Robert C & Kupper TS. Inflammatory skin diseases, T cells, and immune surveillance. *N Engl J Med* 1999; 341: 1817-1828.

Santucci M, Biggeri A, Feller AC, Massi D, Burg G. Efficacy of histologic criteria for diagnosing early mycosis fungoides: an EORTC cutaneous lymphoma study group investigation. European Organization for Research and Treatment of Cancer. *Am J Surg Pathol* 2000; 24: 40-50.

Schrek R. Ultrastructure of the blood lymphocytes from chronic lymphocytic and lymphosarcoma cell leukemia. *J Natl Cancer Inst* 1972; 48: 51-64.

Sinha AK, Singh MK, Dinda AK, Ramam M. morphometric study of lymphoid cells in mycosis fungoides and its simulators. *Indian J Pathol Microbiol* 2003; 46: 28-33.

Shum DT, Roberts JT, Smout MS, Wells GA, Simon GT. The value of nuclear contour index in the diagnosis of mycosis fungoides. An assessment of current ultrastructural morphometric diagnosis criteria. *Cancer* 1986; 57: 298-304.

Smoller BR, Bishop K, Glusac E, Kim YH, Hendrickson M. Reassessment of histologic parameters in the diagnosis of mycosis fungoides. *Am J Surg Pathol* 1995; 19: 1423-1430.

Sokol RJ, Hudson G, Wales J, James NT. Ultrastructural morphometry of human leucocytes in health and disease. *Electron Microsc Rev* 1991; 4: 179-195.

Suárez-Varela MMM, Gonzáles AL, Vila AM, Bell J. Mycosis fungoides: review of epidemiological observations. *Dermatology* 2000; 201: 21-28.

van der Loo EM, van Vloten WA, Cornelisse CJ, Scheffer E, Meijer CJLM. Relevance of morphometry in the differential diagnosis of cutaneous T cell lymphomas. *Br J Dermatol* 1981; 104: 257-269.

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

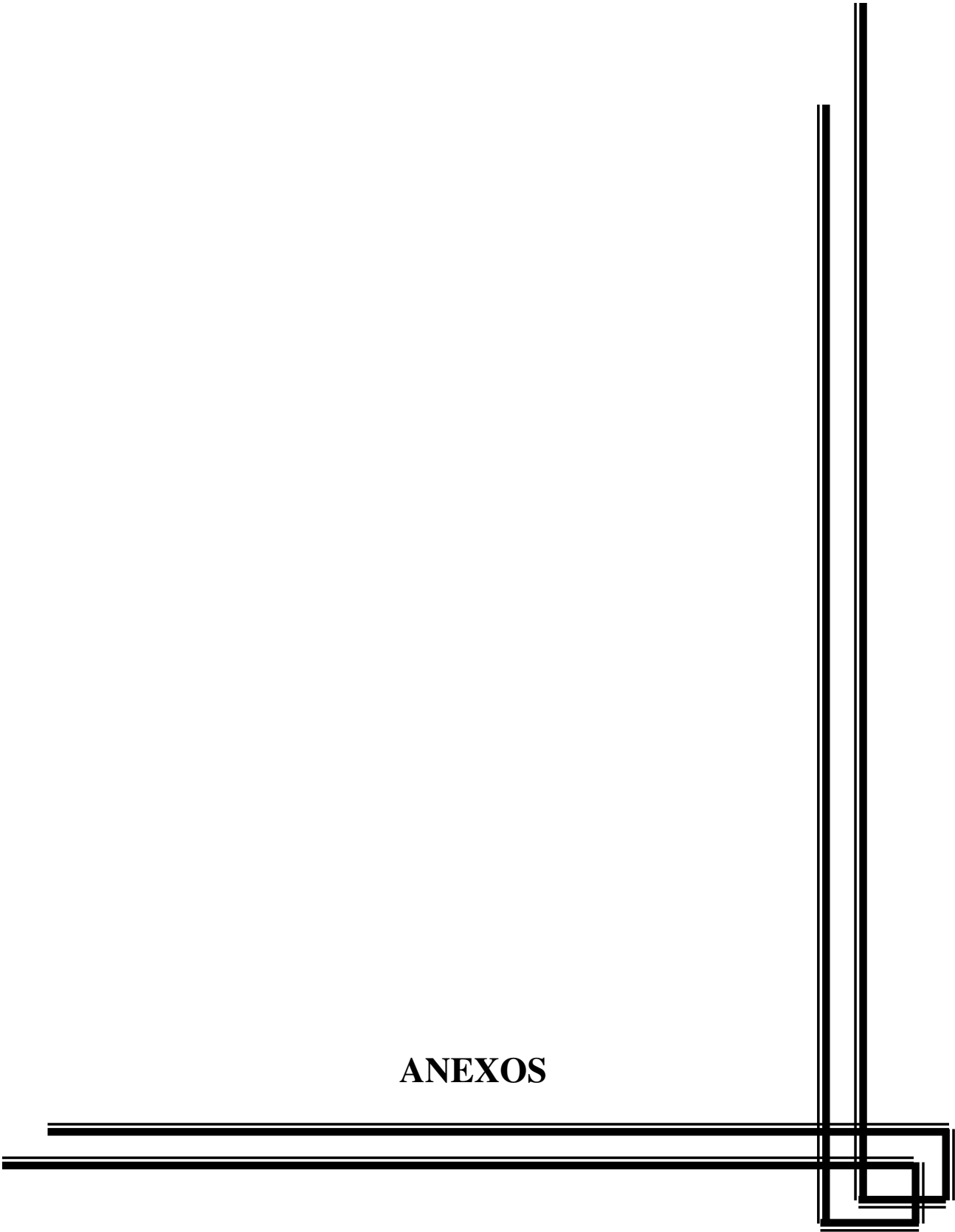
Willemze R, Jaffe ES, Burg G, Cerroni L, Berti E, Swerdlow SH, et al. WHO-EORTC classification for cutaneous lymphomas. *Blood* 2005; 105: 3768-3785.

Wood GS, Tung RM, Haeffner AC, Crooks CF, Liao S, Orozco R, et al. Detection of clonal T-cell receptor gamma gene rearrangements in early mycosis fungoides/Sezary syndrome by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis (PCR/DGGE). *J Invest Dermatol* 1994; 103: 34-41.

Zackheim HS e McCalmont TH. Mycosis fungoides: The great imitator. *J Am Acad Dermatol* 2002; 47: 914-918.

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: 1234-1240.

# ANEXOS





**ANEXO 1-** Expressões do CD3 e do CD7 nos casos de micose fungóide e síndrome de Sézary

<b>BIÓPSIA</b>	<b>CD3 (%)</b>	<b>CD7 (%)</b>
B1160	60	40
B6096	90	10
B9385	90	0
B10832	70	10
B8120	90	40
B8250	80	10
B10501	100	90
RV421	80	0
B24407	90	90
B35120	90	20
B61115	90	80
B71210	100	40
B9188	90	70
B8716	100	10
B3862	80	50
B6896	90	40
B10621	90	90
B5033	80	10
B5562	100	90
B5563	100	80
B10071	90	70
B3720	90	100
B4161	70	80
B166	70	70
B5167	90	90
B1107	90	80
B1183	90	40
B2424	80	70
B12360	80	80
B9202	90	50
<b>Mediana</b>	<b>90</b>	<b>60</b>
<b>Média</b>	<b>86,67</b>	<b>53,33</b>
<b>DP</b>	<b>9,94</b>	<b>32,52</b>
<b>Mínimo</b>	<b>60</b>	<b>0</b>
<b>Máximo</b>	<b>100</b>	<b>100</b>

**ANEXO 2-** Expressões do CD3 e do CD7 nos casos controle.

<b>BIÓPSIA</b>	<b>CD3 (%)</b>	<b>CD7 (%)</b>
B12122	100	90
B11315	90	80
B4785	30	90
B7070	90	40
B11980	60	70
B1413	100	90
B1562	30	100
B5217	90	70
B7334	90	70
B8175	90	80
B10344	100	30
<b>Mediana</b>	<b>90</b>	<b>80</b>
<b>Média</b>	<b>79.091</b>	<b>73.636</b>
<b>DP</b>	<b>26.629</b>	<b>21.574</b>
<b>Mínimo</b>	<b>30</b>	<b>30</b>
<b>Máximo</b>	<b>100</b>	<b>100</b>

**ANEXO 3-** Valores das médias das variáveis morfométricas dos casos de micose fungóide e síndrome de Sézary.

<b>Biópsia</b>	<b>Área (<math>\mu\text{m}^2</math>)</b>	<b>Perímetro (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>ICN</b>	<b>Dmax (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>Dmin (<math>\mu\text{m}</math>)</b>
B3720	26,84	24,57	5,11	4,80	7,17
B9188	19,88	19,57	4,40	4,43	6,15
B3862	24,41	22,44	4,88	4,59	6,87
B166	20,05	19,63	4,44	4,41	6,06
B1107	19,89	19,69	4,40	4,45	5,91
B1160	22,57	21,24	4,70	4,50	6,55
B9202	23,77	21,96	4,83	4,53	6,49
B6856	24,23	22,41	4,90	4,57	6,66
B4161	25,11	22,74	4,98	4,56	6,74
B5563	24,69	22,23	4,95	4,49	6,68
B24407	26,09	23,99	5,06	4,72	7,23
B35120	22,51	21,40	4,71	4,52	6,63
B9385	23,47	21,50	4,82	4,46	6,52
B2424	22,58	21,71	4,69	4,62	7,01
B10071	21,18	20,04	4,57	4,38	6,26
B5033	20,99	19,67	4,53	4,33	6,07
B10621	20,73	19,85	4,52	4,38	6,15
B12360	20,78	20,93	4,52	4,61	6,54
B1183	22,13	20,70	4,67	4,42	6,30
B5562	24,15	23,32	4,88	4,77	6,98
B6096	20,42	20,14	4,46	4,49	6,20
B8120	22,46	21,20	4,69	4,49	6,82
B8250	22,64	20,41	4,72	4,32	6,22
B10501	26,87	24,45	5,05	4,76	7,28
B6115	22,82	21,54	4,74	4,54	6,46
RV421	21,84	21,80	4,62	4,69	6,76
B71210	21,76	20,23	4,63	4,36	6,25
B10832	21,43	20,78	4,59	4,52	6,31
B8716	20,59	20,99	4,48	4,67	6,53
B5167	22,03	21,21	4,65	4,54	6,52
<b>Mediana</b>	<b>22,48</b>	<b>21,22</b>	<b>4,52</b>	<b>6,52</b>	<b>4,67</b>
<b>Média</b>	<b>22,63</b>	<b>21,41</b>	<b>4,53</b>	<b>6,54</b>	<b>4,73</b>
<b>DP</b>	<b>1,98</b>	<b>1,40</b>	<b>0,13</b>	<b>0,36</b>	<b>0,25</b>
<b>Mínimo</b>	<b>19,88</b>	<b>19,57</b>	<b>4,32</b>	<b>5,91</b>	<b>4,36</b>
<b>Máximo</b>	<b>26,87</b>	<b>24,57</b>	<b>4,8</b>	<b>7,28</b>	<b>5,19</b>

ICN: Índice de contorno nuclear; Dmáx: Diâmetro máximo; Dmin: Diâmetro mínimo.

**ANEXO 4-** Valores das médias das variáveis morfométricas dos casos do grupo controle.

<b>Biópsia</b>	<b>Área (<math>\mu\text{m}^2</math>)</b>	<b>Perímetro (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>ICN</b>	<b>Dmax (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>Dmin (<math>\mu\text{m}</math>)</b>
B8175	12,72	14,49	3,55	4,08	5,03
B1413	14,52	15,85	3,79	4,18	4,90
B4785	12,36	14,74	3,50	4,22	4,58
B11315	14,20	15,78	3,74	4,22	5,49
B10344	13,63	15,34	3,67	4,18	4,58
B12122	13,38	14,92	3,64	4,10	4,47
B11980	16,62	16,93	4,03	4,18	4,88
B7070	14,04	15,61	3,72	4,20	5,58
B1562	16,38	17,88	4,01	4,45	5,60
B5217	14,56	15,99	3,79	4,21	4,85
B7334	14,99	15,72	3,85	4,08	4,87
<b>Mediana</b>	<b>14,20</b>	<b>15,72</b>	<b>4,18</b>	<b>4,88</b>	<b>3,79</b>
<b>Média</b>	<b>14,31</b>	<b>15,75</b>	<b>4,19</b>	<b>4,98</b>	<b>3,86</b>
<b>DP</b>	<b>1,34</b>	<b>0,97</b>	<b>0,10</b>	<b>0,40</b>	<b>0,25</b>
<b>Mínimo</b>	<b>12,36</b>	<b>14,49</b>	<b>4,08</b>	<b>4,47</b>	<b>3,44</b>
<b>Máximo</b>	<b>16,62</b>	<b>17,88</b>	<b>4,45</b>	<b>5,60</b>	<b>4,25</b>

ICN: Índice de contorno nuclear; Dmáx: Diâmetro máximo; Dmin: Diâmetro mínimo.

**ANEXO 5-** Valores de corte das variáveis morfométricas estabelecidos pela curva ROC.

<b>Variáveis</b>	<b>Valor de corte</b>	<b>Sensibilidade (%)</b>	<b>Especificidade (%)</b>
Área nuclear	18,25 $\mu\text{m}^2$	100	100
Perímetro nuclear	18,75 $\mu\text{m}$	100	100
Índice de contorno nuclear	4,25	100	90,9
Diâmetro nuclear máximo	5,75 $\mu\text{m}$	100	100
Diâmetro nuclear mínimo	4,35 $\mu\text{m}$	100	100

**ANEXO 6-** Valores das médias das variáveis morfométricas/fases da micose fungóide e síndrome de Sézary.

<b>Biópsia</b>	<b>Área (<math>\mu\text{m}^2</math>)</b>	<b>Perímetro (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>ICN</b>	<b>Dmax (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>Dmin (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>Fase</b>
B1107	19,887	19,691	4,451	5,912	4,516	Mancha
B6096	20,419	20,142	4,489	6,198	4,466	Mancha
B8716	20,595	20,989	4,666	6,525	4,514	Mancha
B10621	20,733	19,846	4,376	6,146	4,494	Mancha
B12360	20,785	20,932	4,615	6,538	4,471	Mancha
B5033	20,989	19,671	4,330	6,071	4,487	Mancha
B10071	21,179	20,042	4,376	6,257	4,550	Mancha
B71210	21,761	20,229	4,360	6,251	4,619	Mancha
RV421	21,842	21,796	4,695	6,760	4,612	Mancha
B5167	22,030	21,209	4,540	6,522	4,706	Mancha
B1183	22,130	20,702	4,416	6,298	4,780	Mancha
B35120	22,508	21,396	4,523	6,633	4,665	Mancha
B1160	22,571	21,240	4,498	6,547	4,651	Mancha
B6115	22,822	21,544	4,545	6,456	4,765	Mancha
B9385	23,469	21,504	4,455	6,522	4,883	Mancha
B3862	24,415	22,441	4,587	6,873	4,888	Mancha
B5563	24,693	22,232	4,489	6,676	5,052	Mancha
B4161	25,110	22,738	4,560	6,744	5,130	Mancha
B24407	26,092	23,990	4,715	7,232	5,132	Mancha
B9188	19,880	19,570	4,433	6,146	4,362	Placa
B166	20,054	19,628	4,408	6,057	4,429	Placa
B10832	21,428	20,784	4,515	6,309	4,682	Placa
B8120	22,461	21,198	4,490	6,818	4,532	Placa
B2424	22,579	21,713	4,615	7,006	4,567	Placa
B8250	22,643	20,414	4,316	6,220	4,753	Placa
B9202	23,771	21,959	4,526	6,491	5,028	Placa
B5562	24,154	23,324	4,767	6,978	5,027	Placa
B10501	26,870	24,452	4,761	7,280	5,074	Placa
B6856	24,232	22,406	4,574	6,664	4,981	SS
B3720	26,838	24,574	4,801	7,173	5,185	SS

ICN: Índice de contorno nuclear; Dmáx: Diâmetro máximo; Dmin: Diâmetro mínimo; SS: Síndrome de Sézary.