

ANDRÉA FERNANDES ELOY DA COSTA FRANÇA

**ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA E IMUNOHISTOQUÍMICA DAS
LESÕES VITILIGÓIDES NO LÚPUS ERITEMATOSO CUTÂNEO**

CAMPINAS

UNICAMP

2011



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Médicas

ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA E IMUNOHISTOQUÍMICA DAS LESÕES
VITILIGÓIDES NO LÚPUS ERITEMATOSO CUTÂNEO

Andréa Fernandes Eloy Da Costa França

Tese de Doutorado
apresentada à Pós-Graduação
da Faculdade de Ciências
Médicas da Universidade
Estadual de Campinas –
UNICAMP para a obtenção do
título de Doutor em Clínica
Médica, área de concentração
em Dermatologia. Sob
orientação do Prof. Dr. Elemir
Macedo de Souza

Campinas, 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROSANA EVANGELISTA PODEROSO – CRB8/6652 - BIBLIOTECA DA FACULDADE
DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

F844a França, Andréa Fernandes Eloy da Costa, 1977-
Análise Histopatológica e imunohistoquímica das
lesões vitiligóides no lúpus eritematoso cutâneo. / Andréa
Fernandes Eloy da Costa França. -- Campinas, SP:
[s.n.], 2011.

Orientador: Elemir Macedo de Souza
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Lúpus eritematoso cutâneo. 2. Vitiligo. 3.
Histologia. 4. Imunoistoquímica. I. Souza, Elemir
Macedo de. II Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Histopathology and immunohistochemistry of depigmented
lesions in lupus erythematosus

Palavra-chave em inglês:

Cutaneous lupus erythematosus

Vitiligo

Histopathology

Immunohistochemistry

Área de concentração: Clínica Médica

Titulação: Doutor em Clínica Médica

Banca examinadora:

Elemir Macedo de Souza [Orientador]

José Antônio Sanches Junior

Paulo Ricardo Criado

Paulo Eduardo Neves Ferreira Velho

Renata Ferreira Magalhães

Data da defesa: 27-04-2011

Programa de Pós-Graduação: Faculdade de Ciências Médicas

Banca examinadora da tese de Doutorado

Andréa Fernandes Eloy da Costa França

Orientador: Prof. Dr. Elemir Macedo de Souza

Membros:

1. Prof. Dr. José Antônio Sanches Junior

2. Prof. Dr. Paulo Ricardo Criado

3. Prof. Dr. Paulo Eduardo Neves Ferreira Velho

4. Prof^a. Dr^a. Renata Ferreira Magalhães

5. Prof. Dr. Elemir Macedo de Souza

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

Data: 27/04/2011

Ao meu esposo Marcondes pelo
apoio em todas as horas e por servir
de inspiração para a continuidade do
trabalho acadêmico

Ao meu amado primogênito
Arthur e ao Gustavo que está por vir

Aos meus pais, Alberto e Regina,
com carinho e gratidão

AGRADECIMENTOS

Ao meu eterno professor Dr. Elemir Macedo de Souza, por servir de exemplo como médico dermatologista e pelo aprendizado constante.

À prof. Dra. Maria Letícia Cintra, pela ajuda em todos os momentos e pelo conhecimento transmitido.

Às funcionárias do laboratório de Imunohistoquímica da Pós-Graduação do Departamento de Anatomia Patológica, Luzia e Cláudia, pela colaboração e solicitude.

À Michelle Etienne, pelas dicas para superar os obstáculos durante a realização deste trabalho.

Aos pacientes do Ambulatório de Colagenoses da Disciplina de Dermatologia.

O mistério das cousas, onde está ele?
Onde está ele que não aparece
Pelo menos a mostrar-nos que é mistério?
Que sabe o rio disso e que sabe a árvore?
E eu, que não sou mais do que eles, que sei disso?
Sempre que olho para as cousas e penso no que os homens pensam delas,
Rio como um regato que soa fresco numa pedra.

Porque o único sentido oculto das cousas
É elas não terem sentido oculto nenhum.
É mais estranho do que todas as estranhezas
E do que os sonhos de todos os poetas
E os pensamentos de todos os filósofos,
Que as cousas sejam realmente o que parecem ser
E não haja nada que compreender.

Sim, eis o que os meus sentidos aprenderam sozinhos:--
As cousas não têm significado: tem existência.
As cousas são o único sentido oculto das cousas.
(Alberto Caieiro)

| | Pág. |
|--|-------------|
| RESUMO | xxiii |
| ABSTRACT | xxvii |
| 1- INTRODUÇÃO | 31 |
| 1.1- Lúpus Eritematoso Cutâneo | 33 |
| 1.2 – Vitiligo | 36 |
| 1.3 – Biologia da despigmentação | 37 |
| 1.4 – Investigação da despigmentação | 38 |
| 2- OBJETIVOS | 41 |
| 3- MATERIAL E MÉTODOS | 45 |
| 3.1. Tamanho amostral e seleção do grupo de estudo | 47 |
| 3.2. Critérios de inclusão | 47 |
| 3.3. Critérios de exclusão | 48 |
| 3.4. Coleta de dados | 48 |
| 3.4.1 Quadro clínico | 48 |
| 3.4.2 Exames laboratoriais | 48 |
| 3.4.3. Análise histológica | 49 |
| 3.5. Análise e processamento de dados | 52 |

| | |
|--|------------|
| 4- RESULTADOS | 53 |
| 4.1. Dados clínicos e laboratoriais | 55 |
| 4.2. Avaliação histológica (grupo 1) | 59 |
| 4.3. Avaliação histológica comparativa (grupo 1 e 2) | 65 |
| 5- DISCUSSÃO..... | 71 |
| 6- CONCLUSÕES..... | 83 |
| 7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 87 |
| 8- ANEXOS..... | 101 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|----------------|------------------------------------|
| FAN | Fator Antinúcleo |
| FM | Fontana Masson |
| H&E | Hematoxilina-Eosina |
| LE | Lúpus Eritematoso |
| LEC | Lúpus Eritematoso Cutâneo |
| LECA | Lúpus Eritematoso Cutâneo Agudo |
| LECC | Lúpus Eritematoso Cutâneo Crônico |
| LECD | Lúpus Eritematoso Crônico Discóide |
| LECSA | Lúpus Eritematoso Cutâneo Subagudo |
| LES | Lúpus Eritematoso Sistêmico |
| PAS | Acido Periódico de Schiff |
| ZMB | Zona da Membrana Basal |

LISTA DE QUADROS, TABELAS E GRÁFICOS

| | Pág. |
|--|-------------|
| QUADRO I. Classificação de Gilliam das lesões cutâneas associadas ao LE | 34 |
| QUADRO II. Sítios da disfunção melanocítica nos distúrbios da pigmentação | 37 |
| QUADRO III. Achados clínicos dos pacientes lúpicos com lesões vitiligóides | 56 |
| QUADRO IV. Achados histológicos das lesões vitiligóides nos pacientes lúpicos | 60 |
| QUADRO V. Melanização e contagem de melanócitos nos pacientes com LE | 61 |
| TABELA I. Achados histológicos dos pacientes dos grupos 1 (lúpus) 2 (vitiligo) | 65 |
| QUADRO VI. Contagem de melanócitos pelo HMB45 e MelanA nos grupos 1 (lúpus) e 2 (vitiligo) | 66 |
| GRÁFICO I. Box-and-whiskers-plots com a contagem de melanócitos/mm nos pacientes com lúpus, vitiligo e controles pelo anticorpo Melan A (A) e HMB45 (B) | 67 |

| | Pág. |
|---|-------------|
| FIGURA 1. LECD com lesão infraauricular evidenciando atividade em seu pólo superior e área vitiligóide no pólo inferior (paciente nº 02) | 57 |
| FIGURA 2. LECC, forma hipertrófica/verrucosa, com lesões vitiligóides (paciente nº 09) | 57 |
| FIGURA 3. LECSA com lesões eritematoacrômicas (paciente nº 05) | 58 |
| FIGURA 4. Lesões vitiligóides do LECSA durante inatividade (A) e atividade da doença (B) (paciente nº 07) | 58 |
| FIGURA 5. Hiperceratose e epiderme com atrofia e retificação. Na derme há fibrose e elastose (H&E x200) | 63 |
| FIGURA 6. Espessamento da zmb e infiltrado liquenóide focal (PAS x200) | 63 |
| FIGURA 7. (A) Corpos colóides e (B) ceratinócitos apoptóticos (H&E x400) | 64 |
| FIGURA 8. Incontinência pigmentar (FM x200) | 64 |
| FIGURA 9. Vitiligo. Infiltrado inflamatório leve (A) e liquenóide (B) (H&E x200) | 68 |
| FIGURA 10. Imunohistoquímica pelo HMB45 no vitiligo (A) (x200) e no lúpus (B) (x100) | 68 |
| FIGURA 11. Imunohistoquímica pelo Melan-A no vitiligo (A) e no lúpus (B) (x200). O número de melanócitos está marcadamente diminuído em ambas as lâminas | 69 |

RESUMO

O lúpus eritematoso (LE) é uma doença autoimune com espectro clínico variado. O lúpus eritematoso cutâneo (LEC) inclui o lúpus eritematoso agudo (LECA), o subagudo (LECSA) e o crônico (LECC). Lesõesacrômicas podem ocorrer durante a evolução do LE, embora nunca tenham sido estudadas histologicamente. O objetivo deste trabalho é descrever os achados clínicos, laboratoriais e histológicos das lesõesacrômicas no LE. Foram selecionados 12 pacientes com LE de um grupo de 220 atendidos no período de 2005 a 2008, sendo sete com LECC e cinco com LECSA. Doze pacientes com vitiligo e 10 controles de pele são foram usados para comparação. As alterações histológicas encontradas foram: infiltrado inflamatório (75%); hiperqueratose e espessamento da zona da membrana basal (ZMB) (66,7%); retificação da epiderme (58,3%); ceratinócitos apoptóticos epidérmicos, elastose e telangectasias (50%); fibrose (41,7%); degeneração vacuolar da ZMB (33,3%); rolhas córneas (16,7%). O diagnóstico histológico de LE foi possível em quatro casos. Melanina pela coloração de Fontana Masson (FM) foi vista em cinco casos e incontinência pigmentar em quatro. Melanócitos foram evidenciados em amostras de cinco doentes através da reação imunohistoquímica pelo HMB45 e Melan-A, com diferença estatística em relação aos controles. Quando comparado ao vitiligo, a diferença foi estatisticamente significativa para os achados histológicos: ceratinócitos apoptóticos epidérmicos ($p=0,014$), espessamento da ZMB ($p=0,009$) e fibrose ($p=0,037$). Em relação à quantificação dos melanócitos, não houve diferença estatística entre o grupo LE e vitiligo usando os anticorpos Melan-A e HMB45. Concluímos que as lesõesacrômicas no LE correspondem a lesões

residuais, decorrentes de processo inflamatório liquenóide prévio que destrói os melanócitos. Não é possível diferenciar as lesões vitiligóides das duas dermatoses pela presença ou ausência de melanócitos, embora a repigmentação seja possível em ambas as doenças devido a presença de melanogênese ativa comprovada pela positividade pelo HMB45

ABSTRACT

Lupus Erythematosus (LE) is an autoimmune disorder with multiple clinical manifestations. Skin damage is a hallmark of the disease. Cutaneous LE (CLE) includes acute LE (ACLE), subacute LE (SCLE) and chronic LE (CCLE). Although achromic lesions are often found in patients with LEC, there are no detailed data about the histological features of such lesions. Therefore, we designed this study to determine clinical, laboratorial and histological profile of patients with LEC presenting achromic lesions. Between 2005 and 2008, we identified 12 individuals with LEC and acromic lesions from a larger group of 220 patients with LEC that were followed at the Dermatology outpatient clinic. There were seven patients with LECC and five with LECSA. Twelve patients with chronic stable vitiligo and 10 controls of unaffected skin were used for comparison. The most frequent histological abnormalities found in LEC-related achromic lesions were inflammatory infiltrates (75%); hyperkeratosis and thickening of the basement membrane (BM) (66.7%); epidermal flattening (58.3%); apoptotic epidermal keratinocytes, elastosis and vasodilation (50%); fibrosis (41.7%); hydropic degeneration of the basal cells (33.3%); follicular plugging (16.7%). These achromic lesions retained histological features that enabled the diagnosis of CLE to be established in four patients. Fontana Masson (FM) staining was positive for melanin in five cases and revealed pigmentary incontinence in four. Immunohistochemistry for HMB45 and Melan-A identified melanocytes in five CLE-related achromic lesions. Melanocyte counts were significantly smaller in achromic lesions when compared to unaffected skin samples. When compared to vitiligo, CLE-related achromic lesions showed more frequently apoptotic epidermal keratinocytes ($p=0,014$), thickening of the BM ($p=0,009$) and fibrosis ($p=0,037$).

Melanocyte counts according to immunohistochemistry were similar in CLE and vitiligo groups. Our results indicate that CLE-related achromic lesions represent residual scars due to chronic lichenoid inflammation that leads to melanocyte destruction. Melanocyte count does not help to distinguish CLE-related achromic lesions and true vitiligo lesions. Despite this, HMB45 staining was sometimes positive in both conditions, which indicates active melanogenesis and suggests that repigmentation may be possible at least for some individuals.

1- INTRODUÇÃO

1.1. Lúpus Eritematoso Cutâneo

O lúpus eritematoso (LE) é uma doença autoimune com espectro clínico compreendendo formas puramente cutâneas a quadros sistêmicos graves (1). As lesões cutâneas no LE são de grande importância na apresentação clínica da doença. Os critérios para o diagnóstico de lúpus eritematoso sistêmico (LES) do *American College of Rheumatology* incluem quatro manifestações dermatológicas entre os onze critérios sugeridos (2). O acometimento cutâneo é a queixa mais freqüente nos pacientes com LES, sendo descrito com uma freqüência superior a 70% durante o curso da doença (3).

Gilliam (4) propôs uma classificação, baseada em achados clinico-patológicos, em que divide as manifestações cutâneas do lúpus naquelas com histologia específica e não-específica da doença (Quadro I). Usa-se o termo lúpus eritematoso cutâneo (LEC) para descrever apenas a doença cutâneo-específica, que inclui o lúpus eritematoso agudo (LECA), o subagudo (LECSA) e o crônico (LECC) (5).

O LECA ocorre exclusivamente no LES, comumente referido como um *rash* malar em asa de borboleta. O LECC inclui múltiplas apresentações, sendo a mais comum o lúpus eritematoso crônico discóide (LECD). O LECD é classicamente caracterizado por placas eritematosas bem demarcadas (em forma de moeda – daí a denominação discóide) com hiperpigmentação periférica e escamas aderentes em seu interior, recobrando os óstios foliculares. As lesões evoluem com atrofia central e são frequentemente encontradas na face e no couro cabeludo (6). O LECC é duas a três vezes mais freqüente que o LES e os pacientes com essa forma da doença possuem, em geral, um bom prognóstico (3).

O LECSA se apresenta sob a forma de placas eritematosas de aspecto psoriasiforme ou anular policíclico, evoluindo sem atrofia. O LECSA apresenta importante componente de fotossensibilidade, com ocorrência predominantemente na porção superior do tronco, na região esternal, na superfície extensora dos membros superiores e nas mãos, com menor frequência na face (6). Anticorpos anti Ro/SSA são mais frequentes nesse grupo de pacientes (7).

Quadro I. Classificação de Gilliam das lesões cutâneas associadas ao LE

| |
|---|
| I. Doença cutânea-específica (LE cutâneo) |
| A. LE cutâneo agudo (LECA) |
| B. LE cutâneo subagudo (LECSA) |
| (1) forma anular |
| (2) forma papuloescamosa |
| C. LE cutâneo crônico (LECC) |
| (1) clássico discóide (LECD) |
| (2) hipertrófico/verrucoso |
| (3) lúpus profundo/paniculite lúpica |
| (4) LECD mucoso |
| (5) Lúpus túmido |
| (6) Perniose lúpica |
| (7) LECD liquenóide |
| II. Doença cutânea não-específica |
| A. Doença cutânea vascular |
| (1) vasculite |
| (2) vasculopatia |
| (3) telangectasia periungueal |
| (4) livedo reticular |
| (5) tromboflebite |
| (6) fenômeno de Raynaud |
| (7) eritromelalgia |
| B. Alopecia não-cicatricial |
| (1) Pelo lúpico |
| (2) eflúvio telógeno |
| (3) alopecia areata |
| C. Esclerodactilia |
| D. Nódulos reumatóides |
| E. <i>Calcinosis cutis</i> |
| F. Lesões bolhosas não-específicas |
| G. Urticária |
| H. Mucínose papulo-nodular |
| I. Cutis laxa/anetodermia |
| J. Acantose nigricante |
| K. Eritema multiforme |
| L. Úlceras de membros inferiores |
| M. Líquen plano |

A mais importante alteração histológica no LEC é a degeneração hidrópica ou vacuolar das células da camada basal da epiderme, também chamada degeneração por liquefação. Na sua ausência, um diagnóstico histológico preciso deve ser feito com cautela e somente quando outros achados anatomopatológicos favorecerem o lúpus (7). No LECD, a hiperkeratose é mais evidente, com a presença de rolhas córneas infundibulares (tamponamento folicular) e espessamento da zona da membrana basal (ZMB). O infiltrado inflamatório, predominantemente linfocitário, tem localização perivascular e perianexial, podendo acometer a junção dermoepidérmica e adquirir aspecto liquenóide. Ceratinócitos apoptóticos epidérmicos e dérmicos (corpos colóides), assim como melanófagos dérmicos podem estar presentes como resultado da agressão à camada basal. As lesões do LECSA, quando comparadas às do LECD, apresentam um menor grau de hiperkeratose, incontinência pigmentar e inflamação. No entanto, nem sempre é possível diferenciar histologicamente as formas subagudas e crônicas do lúpus cutâneo, devido à superposição de achados (8).

Lesões acrômicas podem ser encontradas em todas as formas clínicas do lúpus. No LECD, tais lesões surgem após a resolução das lesões discóides (1). No LECSA, lesões vitiligóides podem representar um estágio temporário de longa duração ou mesmo definitivo na evolução das lesões clássicas (9). Walsh et al (10) descreveram dois pacientes com LES e despigmentação cutânea extensa responsiva a hidroxiquina. A frequência das lesões acrômicas nos quadros de lúpus cutâneo nunca foi descrita.

1.2. Vitiligo

O vitiligo é o protótipo de dermatose acrômica. Estudos de microscopia eletrônica (11) e de imunohistoquímica (12) sugerem que o evento final no vitiligo é a ausência completa de melanócitos. Três hipóteses têm sido propostas para explicar a destruição dos melanócitos. Uma delas é a de que o vitiligo é uma doença autoimune (13,14). Essa hipótese é sugerida pela sua freqüente associação com doenças autoimunes (15,16,17) e pela detecção de anticorpos circulantes contra melanócitos nos pacientes com vitiligo e melanoma (18,19). A hipótese neural sugere que os melanócitos poderiam ser lesados por neurotoxinas liberadas ou produzidas nas terminações nervosas (20). Essa teoria é reforçada pela existência do vitiligo segmentar. Há ainda a hipótese da autodestruição dos melanócitos por metabólitos intermediários da biossíntese de melanina. O vitiligo resultaria de um desequilíbrio nos mecanismos protetores dos melanócitos contra essas substâncias (21,22,23). Por fim, tem sido proposto que o vitiligo resulta de uma combinação dessas causas: uma injúria neural aos melanócitos poderia estimular o metabolismo dessas células e levar a superprodução de metabólitos tóxicos, que, por sua vez, lesariam as células epidérmicas e causaria a liberação de antígenos pigmentares. Esses antígenos disparariam uma resposta celular imunomediada, que causaria mais injúria aos melanócitos (24,25).

Na ausência de manifestações cutâneas típicas, as lesões acrômicas no lúpus podem simular outros quadros discrômicos, em especial o vitiligo. A associação entre as duas doenças já foi descrita (26,27,28) mas quando o quadro

inflamatório clássico do lúpus é inaparente, o diagnóstico diferencial pode ser muito difícil, tanto clínica quanto histologicamente (29) .

1.3. Biologia da despigmentação

Lesões despigmentadas ocorrem em uma ampla variedade de dermatoses, como manifestações transitórias ou definitivas (30). Com exceção do vitiligo, a investigação histológica voltada para a causa da despigmentação foi muito pouco estudada nas dermatoses.

Segundo Ortonne et al (24), a despigmentação observada em algumas dermatoses pode ser secundária a alterações funcionais na produção e/ou transferência de melanina entre as células epidérmicas, como evidenciado no quadro II.

Quadro II. Sítios da disfunção melanocítica nos distúrbios da pigmentação

| Defeito | Distúrbio da pigmentação |
|---|--|
| Migração e diferenciação anormal dos melanoblastos | Piebaldismo; Síndrome de Waardenburg, síndrome de Woolf |
| Diminuição da atividade da tirosinase | Albinismo tirosinase negativo |
| Estrutura anormal dos melanossomos | <i>Ash leaf spots</i> (esclerose tuberosa); síndrome de Chediak-Higashii |
| Diminuição da melanização dos melanossomos | Albinismo tirosinase positivo; <i>ash leaf spots</i> (esclerose tuberosa); <i>incontinentia pigmenti</i> ; pitíriase versicolor; hipomelanose macular idiopática |
| Diminuição da transferência (aos ceratinócitos) ou aumento da degradação (no interior dos melanócitos) dos melanossomos | Nevo despigmentoso; pitíriase alba; hipopigmentação pós-inflamatória; pitíriase versicolor; síndrome de Chediak-Higashi |

As dermatoses inflamatórias e infecciosas que evoluem com despigmentação incluem a sarcoidose, a psoríase, a dermatite atópica, o LEC, a micose fungóide, a hanseníase, entre outras. Na sarcoidose e na hanseníase tuberculóide, a contagem dos melanócitos é semelhante entre a área doente e a

área sã, porém a melanogênese encontra-se suprimida, provavelmente devido a algum fator liberado pelos granulomas dérmicos (31,32,33,34). No eczema e na psoríase, as lesões hipocrômicas são decorrentes do bloqueio na transferência dos melanossomos dos melanócitos para os ceratinócitos (35). A análise ultraestrutural das lesões hipocrômicas de linfomas cutâneos de células T revelou alterações degenerativas nos melanócitos e melanogênese anormal com melanossomas esféricos, adicionalmente ao padrão inflamatório característico (36).

Não havia estudos sobre o comportamento dos melanócitos nas lesões acrômicas do lúpus cutâneo. Não se sabia se a acromia cutânea era resultante da destruição dos melanócitos pelo processo inflamatório e/ou de sua hipofunção induzida pela complexa interação ceratinócito/melanócito.

1.4. Investigação da despigmentação

O estudo sobre a quantificação do pigmento melânico, a distribuição e o comportamento dos melanócitos em biópsias de pele pode ser feito através de técnicas histológicas e imunohistoquímicas. A coloração histoquímica pelo nitrato de prata amoniado (Fontana Masson) permite a identificação da melanina presente no interior dos melanócitos e ceratinócitos epidérmicos e nos melanófagos dérmicos. A coloração pela hematoxilina-eosina (H&E), adotada rotineiramente em todas as análises histológicas, permite a identificação de melanócitos na epiderme, porém existem técnicas imunohistoquímicas mais sensíveis.

Os anticorpos monoclonais HMB45 e Melan-A são marcadores imunohistoquímicos específicos da linhagem melanocítica (37). O anticorpo HMB45 reage contra um antígeno citoplasmático, a glicoproteína gp100, cuja expressão indica a presença de melanogênese ativa. A imunohistoquímica com HMB45 é positiva na maioria dos melanomas, alguns nevos, melanocitos fetais e em melanócitos adultos estimulados, sendo útil na identificação de melanócitos funcionalmente ativos (38,39). O Melan-A é uma pequena proteína citoplasmática de 22kd, correspondente a um componente melanossomal. É expresso na pele normal, nos nevos melanocíticos e nos melanomas, sendo útil para a identificação adicional de melanócitos intraepidérmicos, como no vitiligo, e nos melanomas amelanóticos (40,41).

2 - OBJETIVOS

Objetivo Geral

Descrever os achados clínicos, laboratoriais e histológicos dos pacientes com LEC que possuam lesões vitiligóides.

Objetivos Específicos

1. Avaliar se as lesões vitiligóides no LEC apresentam características histológicas que permitam realizar o diagnóstico de LEC;
2. Comparar os achados histológicos encontrados nas lesões vitiligóides do LEC com as lesões de vitiligo;
3. Avaliar a presença de melanócitos epidérmicos nas amostras das lesões vitiligóides de LEC através de técnicas imunohistoquímicas;
4. Comparar o número de melanócitos epidérmicos nas amostras de lesões vitiligóides de LEC, vitiligo e pele normal através de técnicas imunohistoquímicas.

3– MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Tamanho amostral e seleção do grupo de estudo

Como não há descrição da frequência de lesões vitiligóides no LEC, doentes lúpicos do Ambulatório de Colagenoses da Disciplina de Dermatologia do Hospital de Clínicas – Unicamp foram acompanhados entre os anos de 2005 e 2008 para seleção daqueles com lesões vitiligóides.

Doze doentes lúpicos com lesões vitiligóides que estavam de acordo com os critérios de inclusão e exclusão foram encontrados em um grupo de 220 pacientes com diagnóstico de LE acompanhados no ambulatório (grupo 1). Foram selecionados, do ambulatório de vitiligo do referido hospital, 12 doentes com o diagnóstico clínico de vitiligo estável (grupo 2).

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp (parecer 028/2005) e ofereceu mínimos riscos aos pacientes incluídos. Os esclarecimentos necessários e a anuência em participar do estudo foram obtidos através da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

3.2. Critérios de inclusão

a) Grupo 1: diagnóstico comprovado de LEC por análise anatomopatológica prévia; presença de lesão vitiligóide ao exame dermatológico. As lesões vitiligóides foram definidas como lesões de pele acrômicas residuais ou ativas, que não possuíssem, ao exame dermatológico, atrofia cutânea, descamação, eritema ou rolhas córneas aparentes. Lesões cutâneas típicas de lúpus poderiam coexistir com as lesões vitiligóides em um mesmo paciente;

b) Grupo 2: diagnóstico clínico de vitiligo estável, definido pela ausência de progressão clínica das lesões nos últimos seis meses, obtida através de informações de prontuário médico e entrevista pessoal com os pacientes.

3.3. Critérios de exclusão

Pacientes que apresentavam coexistência de LEC e vitiligo assim como aqueles pacientes com lesões vitiligóides sem diagnóstico confirmado quanto à etiologia do quadro clínico foram excluídos do estudo.

3.4. Coleta de dados

3.4.1 Quadro clínico

Foram obtidos a partir do prontuário médico: forma clínica do lúpus, diagnóstico histológico de lúpus, idade e quadro clínico da admissão, evolução, doenças associadas e manifestações sistêmicas.

3.4.2 Exames laboratoriais

Foram obtidos a partir do prontuário médico: hemograma completo; fator antinuclear (FAN) pelo método da imunofluorescência indireta, utilizando-se como substrato “imprint” de fígado de camundongo; auto-anticorpo anti-DNA pelo método da imunofluorescência indireta, utilizando-se como antígeno *Chrithidia lucilae*; urina 1; uréia e creatinina.

3.4.3. Análise histológica

Os doentes do grupo 1 (LEC) e 2 (vitiligo) foram submetidos a biópsias das lesões cutâneas vitiligóides com punch de 5mm. Foram selecionadas as lesões que preenchiam os critérios para lesões vitiligóides descritos nos critérios de inclusão e as áreas das biópsias foram classificadas quanto à exposição solar em áreas fotoexpostas e fotoprotegidas. Aleatoriamente, foram selecionados dez pacientes dentro dos dois grupos para realização de biópsia de pele sã da região axilar direita para servir como grupo controle na quantificação dos melanócitos epidérmicos.

Os fragmentos de pele foram fixados em formalina a 10% tamponada, incluídos em parafina e corados pelas técnicas de H&E, ácido periódico de Schiff (PAS), reação histoquímica de nitrato de prata amoniado (Fontana Masson) e *Alcian Blue*. A análise histológica foi feita em microscópio óptico comum, considerando os seguintes achados:

- Epidérmicos
 - a. Hiperqueratose: presente ou ausente;
 - b. Espessura da camada de Malpighi: medida através de ocular milimetrada no aumento óptico de 200x.
 - c. Retificação dos cones epidérmicos;
 - d. Presença de rolas córneas infundibulares;
 - e. Degeneração vacuolar da ZMB;

- f. Espessamento da ZMB pela coloração do PAS: foram avaliados 2 cortes por lâmina em uma amplificação de 400x. Toda a extensão dos cortes foi examinada. O espessamento da ZMB foi considerado contínuo quando presente em pelo menos metade dos campos estudados;
 - g. Presença de ceratinócitos apoptóticos: ceratinócitos eosinófilos e que se desprenderam da epiderme. Os ceratinócitos apoptóticos apresentam núcleo fragmentado, porém ainda discernível;
- Dérmicos
 - a. Presença de corpos colóides: corpúsculos eosinófilos, redondos, homogêneos, que representam ceratinócitos apoptóticos, já sem núcleo.
 - b. Infiltrado inflamatório: classificado quanto ao tipo celular predominante, padrão (liquenóide ou não), localização (perivascular, perianexial), profundidade (superficial, profundo) e intensidade (leve, moderado e intenso);
 - c. Elastose: degeneração basofílica do colágeno;
 - d. Fibrose: classificada quanto à localização (derme superficial ou profunda);
 - e. Alterações vasculares: ectasia vascular e vasculite;
 - f. Deposição de mucina pela coloração de *Alcian Blue*.

As amostras do grupo 1, 2 e controle foram submetidas às seguintes análises para o estudo do conteúdo de melanina e presença de melanócitos:

- a. Reação histoquímica pelo Fontana Masson (FM), para a determinação do conteúdo de melanina. Foram avaliados através desse método, o grau de melanização dos ceratinócitos basais, a quantidade de grânulos de melanina nos melanócitos e a pigmentação dérmica no interior dos melanófagos. Foram avaliados 2 cortes por lâmina a uma amplificação de 200x. O grau de incontinência pigmentar foi considerado contínuo quando presente em pelo menos metade dos campos estudados;
- b. Reação imunohistoquímica utilizando-se anticorpo específico Melan-A (Clone A103, DakoCytomation Denmark A/S) na diluição 1:300, para identificação e quantificação de melanócitos.
- c. Reação imunohistoquímica utilizando anticorpo específico Anti-Melanossomo Humano (Clone HMB45, DakoCytomation Denmark A/S) na diluição 1:100, para identificação e quantificação de melanócitos.

Os critérios para a quantificação dos melanócitos foi o mesmo, tanto para a reação imunohistoquímica pelo HMB45 quanto para o Melan-A. Os melanócitos foram contados em microscópio óptico ao longo de 8 campos contínuos de 400x de amplificação, por corte. Para comparação entre os pacientes lúpicos e os com vitiligo, os melanócitos foram contados ao longo da ZMB em toda a extensão da epiderme e descritos por milímetro linear de epiderme. Neste último caso, os folículos pilosos não foram considerados. Nas duas medidas, foram considerados 2 cortes por lâmina.

As reações imunohistoquímicas foram realizadas no Laboratório de Imunohistoquímica e Imunofluorescência da Pós-graduação do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital de Clínicas da Unicamp.

3.5. Análise e processamento de dados

Os dados foram digitados e armazenados no programa gerenciador de banco de dados SYSTAT 10.2. Foram aplicados testes de análise de variância para variáveis contínuas e teste exato de Fisher ou qui-quadrado para análise de variáveis categóricas. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes

4 – RESULTADOS

4.1. Dados clínicos e laboratoriais

Os achados clínicos dos pacientes do grupo 1 encontram-se no quadro III (p. 56). Apenas 5% de todos os pacientes lúpicos seguidos no Ambulatório de Colagenoses do HC/Unicamp (12/220) atendiam aos critérios de inclusão e exclusão (figuras 1, 2, 3 e 4; p. 57 e 58). O grupo selecionado foi constituído por nove pacientes do sexo feminino e três do sexo masculino, com idades variando entre 18 e 62 anos (idade na inclusão do estudo). A duração média da doença foi de 10,3 anos. Sete pacientes (58,3%) tinham o diagnóstico de LECC e cinco (41,7%) apresentavam LECSA. Dos pacientes com LECC, dois apresentavam a forma hipertrófica/verrucosa (pacientes nº 2 e nº 9) e um possuía quadro de paniculite lúpica (paciente nº 4). Dois dos cinco pacientes com LECSA evoluíram para lúpus sistêmico (pacientes nº 8 e nº 10). Não houve sistematização da doença no subgrupo de pacientes com LECD. Em apenas um doente as lesões vitiligóides ocorreram em área fotoprottegida (paciente nº 5) (8,3%). Achados laboratoriais anormais foram encontrados na metade dos casos (pacientes nº 4, nº5, nº 8, nº 9, nº 10 e nº 11), a maioria consistindo na presença de FAN em baixas titulações e linfopenia.

Quadro III: Achados clínicos dos pacientes lúpicos com lesões vitiligóides

| Caso | Diagnóstico | Sexo | Etnia | Idade | Duração da doença | Localização da lesão | Laboratório |
|-------------|--------------------|-------------|--------------|--------------|--------------------------|-----------------------------|--------------------------------------|
| 1 | LECD | F | C | 41 | 28 | Fotoexposta | Negativo |
| 2 | LECD | F | C | 50 | 18 | Fotoexposta | Negativo |
| 3 | LECD | F | C | 57 | 8 | Fotoexposta | Negativo |
| 4 | LECD | F | C | 39 | 19 | Fotoexposta | FAN 1/320, Leucopenia Linfopenia |
| 5 | LECSA | M | C | 54 | 4 | Fotoprottegida | FAN 1/160, Linfopenia |
| 6 | LECD | F | C | 44 | 5 | Fotoexposta | Negativo |
| 7 | LECSA | F | C | 42 | 4 | Fotoexposta | Negativo |
| 8 | LECSA/LES | F | C | 49 | 5 | Fotoexposta | FAN 1/64, Linfopenia |
| 9 | LECD | M | C | 49 | 5 | Fotoexposta | FAN 1/160, Linfopenia |
| 10 | LECSA/LES | M | C | 18 | 3 | Fotoexposta | FAN 1/160, Linfopenia Proteinúria |
| 11 | LECD | F | C | 44 | 12 | Fotoexposta | FAN1/80 |
| 12 | LECSA | F | C | 62 | 13 | Fotoexposta | Negativo |

C: caucasóide

Leucopenia < 4.000

Linfopenia < 1.500

Proteinúria >300mg/dl



Figura 1. LECD com lesão infraauricular evidenciando atividade no seu pólo superior e área vitiligóide no pólo inferior (paciente nº 02)



Figura 2. LECC, forma hipertrófica/verrucosa, com lesões vitiligóides (paciente nº 09)



Figura 3. LECSA com lesões eritematoacrômicas (paciente nº 05)

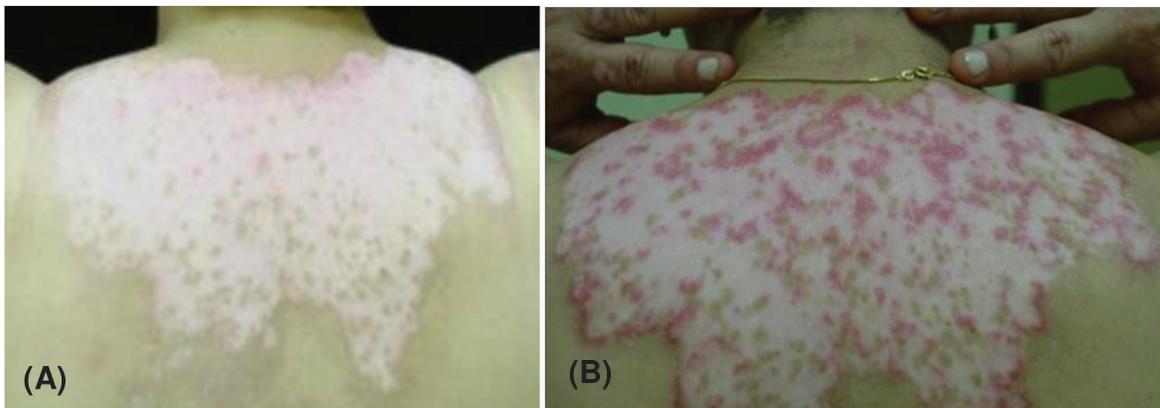


Figura 4. Lesões vitiligóides do LECSA durante inatividade (A) e atividade da doença (B) (paciente nº 07)

4.2. Avaliação histológica (grupo 1)

Os achados histológicos epidérmicos e dérmicos dos pacientes do grupo 1 (lúpus) estão descritos no quadro IV (p. 60).

Na camada córnea, uma leve hiperqueratose sem parakeratose foi encontrada em oito (66,7%) pacientes. Em sete pacientes (58,3%), a camada de Malpighi estava atrófica e com retificação dos cones epiteliais (figura 5, p. 63). A espessura média da camada de Malpighi foi de $51,4 \times 10^{-3} / \text{mm} \pm 14,8$.

Rolhas córneas infundibulares, degeneração vacuolar e espessamento da ZMB (figura 6, p.63) foram encontrados, respectivamente, em dois (16,7%), quatro (33,3%) e oito (66,7%) casos. Em todos os casos, a degeneração vacuolar da ZMB foi leve e focal. Ceratinócitos apoptóticos epidérmicos foram encontrados na metade dos casos e corpos colóides dérmicos foram vistos em três (25%), sendo que em um deles havia agressão de ceratinócitos epidérmicos concomitantemente (figura 7, p.64).

Em nove (75%) pacientes observou-se um infiltrado inflamatório linfocitário, superficial, de leve a moderado, localizado predominantemente ao redor dos vasos e apêndices. Em dois casos, o infiltrado tinha o padrão focalmente liquenóide (pacientes nº 6 e nº 10) (figura 6, p.64). Em nenhum caso foi observado deposição de mucina pelo H&E ou pela coloração de *Alcian Blue*.

Alterações degenerativas da derme, incluindo ectasias vasculares e elastose foram encontradas em seis (50%) pacientes e fibrose dérmica em cinco (41,7%). Em quatro doentes, observou-se que a fibrose era constituída por fibras colágenas agrupadas e distribuídas horizontalmente acima do material elastótico (figura 5, p. 63). Em apenas um caso a fibrose existia sem elastose.

Quadro IV. Achados histológicos das lesões vitiligóides nos pacientes lúpicos

| Caso | Epiderme | | | | | Derme | | | | | | |
|------|---------------|---------|--------------------|--------------------------|---------------------------|------------------|-----------------|--------------------|----------|---------|------------------|-----------------|
| | Hiperkeratose | Atrofia | Rolhas Foliculares | Degeneração Vacuolar ZMB | Ceratinócitos apoptóticos | Espessamento ZMB | Corpos colóides | Infiltrado celular | Elastose | Fibrose | Ectasia vascular | Depósito mucina |
| 1 | Sim | Sim | Não | Não | Não | Não | Sim | Não | Sim | Sim | Sim | Não |
| 2 | Sim | Sim | Não | Não | Não | Sim | Não | Sim | Sim | Sim | Sim | Não |
| 3 | Não | Não | Não | Não | Sim | Não | Não | Sim | Não | Não | Não | Não |
| 4 | Sim | Sim | Sim | Sim | Sim | Sim | Não | Não | Sim | Sim | Não | Não |
| 5 | Sim | Sim | Não | Não | Não | Sim | Não | Sim | Não | Não | Não | Não |
| 6 | Sim | Não | Não | Sim | Sim | Sim | Não | Sim | Não | Não | Não | Não |
| 7 | Não | Sim | Sim | Não | Não | Sim | Não | Sim | Não | Não | Sim | Não |
| 8 | Não | Não | Não | Não | Sim | Sim | Não | Sim | Não | Sim | Não | Não |
| 9 | Sim | Não | Não | Sim | Não | Sim | Sim | Sim | Sim | Não | Sim | Não |
| 10 | Sim | Não | Não | Sim | Sim | Sim | Sim | Sim | Não | Não | Sim | Não |
| 11 | Não | Sim | Não | Não | Sim | Não | Não | Não | Sim | Sim | Não | Não |
| 12 | Sim | Sim | Não | Não | Não | Não | Não | Sim | Sim | Não | Sim | Não |

Considerando os subtipos de lúpus cutâneo (LECD e LECSA), não houve diferença estatística na frequência de achados histológicos nas colorações pelo H&E ($p > 0,05$ para todas as variáveis).

Em quatro pacientes (nº 4, 6, 9 e 10) foi possível fazer o diagnóstico de lúpus com base nos achados histológicos das lesões cutâneas vitiligóides. Três desses pacientes possuíam, através de biópsias prévias, o diagnóstico de LECD (pacientes nº 4, 6 e 9) e um de LECSA com evolução para LES. As alterações histológicas encontradas em todos os pacientes para a confirmação diagnóstica foram a hiperqueratose, os ceratinócitos apoptóticos, a degeneração hidrópica e o espessamento da ZMB. Não foi possível fazer a diferença histológica entre as formas crônica e subaguda de lúpus com base na análise das lesões vitiligóides.

O quadro V descreve os achados histológicos relacionados ao conteúdo de melanina e a contagem de melanócitos do grupo 1 (lúpus).

Quadro V: Melanização e contagem de melanócitos nos pacientes com LE

| Caso | Diagnóstico | Melanização* | Melanófagos dérmicos* | Melanócitos HMB45** | Melanócitos Melan-A** |
|------|-------------|--------------|-----------------------|---------------------|-----------------------|
| 1 | LECD | Ausente | Ausente | Ausente | Ausente |
| 2 | LECD | Ausente | Ausente | Ausente | Ausente |
| 3 | LECD | Ausente | Ausente | Ausente | Ausente |
| 4 | LECD | Ausente | Ausente | Ausente | Ausente |
| 5 | LECSA | Presente | Ausente | 7 | 10 |
| 6 | LECD | Presente | Ausente | 7 | 12 |
| 7 | LECSA | Ausente | Presente | Ausente | Ausente |
| 8 | LECSA | Presente | Presente | 13 | 31 |
| 9 | LECD | Ausente | Ausente | Ausente | Ausente |
| 10 | LECSA | Presente | Presente | 15 | 22 |
| 11 | LECD | Presente | Presente | 10 | 10 |
| 12 | LECSA | Ausente | Ausente | Ausente | Ausente |

* pelo Fontana Masson

** contados em 8 campos contínuos de 400x de amplificação

A reação histoquímica pelo FM evidenciou grânulos epidérmicos de melanina em cinco (41,7%) pacientes e melanófagos dérmicos em quatro (33,3%). O conteúdo de melanina apresentava distribuição heterogênea ao longo da ZMB e estava restrito aos ceratinócitos basais. Em três casos a incontidência pigmentar foi vista em toda a extensão do corte (figura 8, p.64). Todas as amostras com melanização basal evidenciada pelo FM foram também coradas na imunohistoquímica pelos anticorpos Melan-A e HMB45.

O número de melanócitos marcados pelo HMB45 foi significativamente inferior entre os pacientes lúpicos em relação aos controles ($4,3 \pm 5,7$ vs $29,5 \pm 17,4$ $p < 0,001$). Achados semelhantes foram encontrados em relação à marcação pelo Melan-A ($7,1 \pm 10,3$ vs $60,1 \pm 24,9$ $p = 0,005$). Não houve diferença estatística na contagem de melanócitos entre os anticorpos HMB45 e Melan-A nos pacientes lúpicos, embora a intensidade da marcação para o Melan-A tenha sido mais intensa.

Dos preparados dos cinco doentes que evidenciaram melanócitos pela imunohistoquímica, três tinham o diagnóstico de LECSA e dois de LECD. Considerando todos os pacientes lúpicos, amostras evidenciando pelo menos um melanócito à imunohistoquímica foram encontradas em 60% dos casos de LECSA, mas em apenas 28,6% do pacientes com LECD ($p > 0,05$).

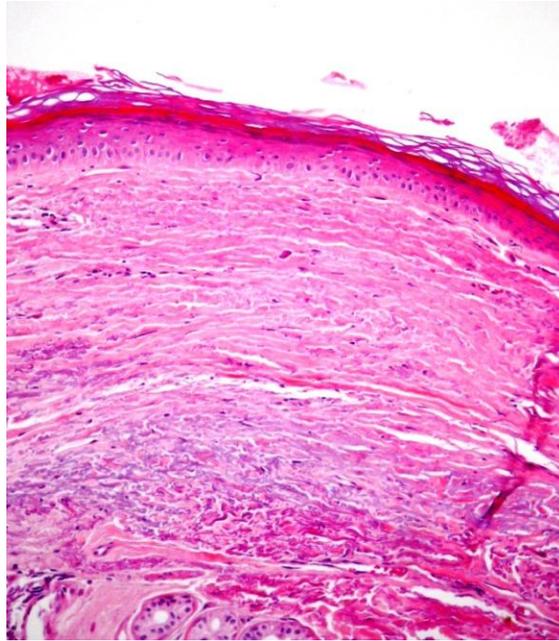


Figura 5. Hiperceratose e epiderme com atrofia e retificação. Na derme há fibrose e elastose (H&E x200)

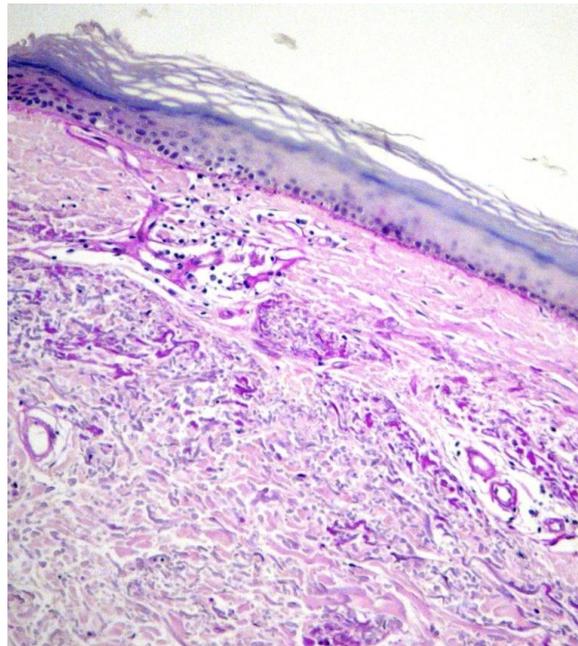


Figura 6. Espessamento da zmb e infiltrado liquenóide focal (PAS x200)

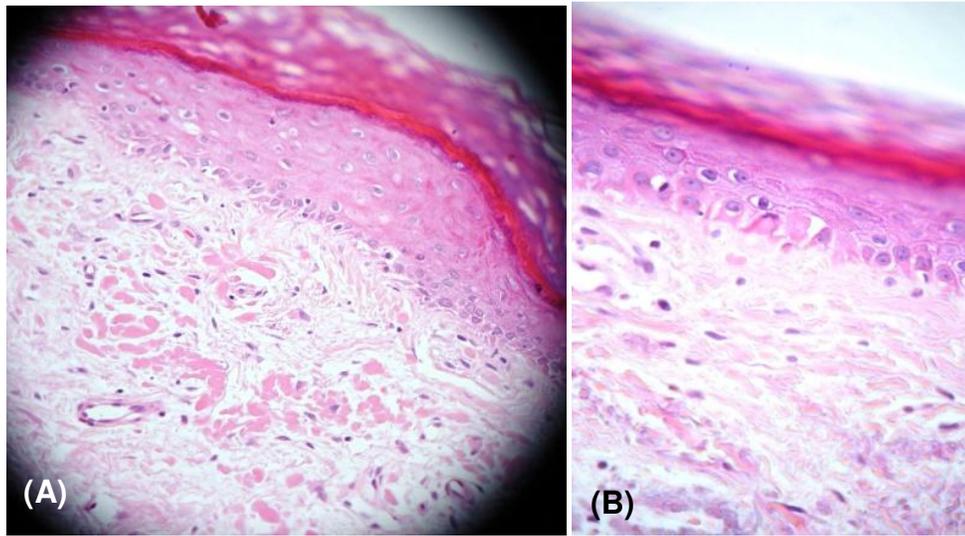


Figura 7. (A) Corporos colóides e (B) ceratinócitos apoptóticos (H&E x400)

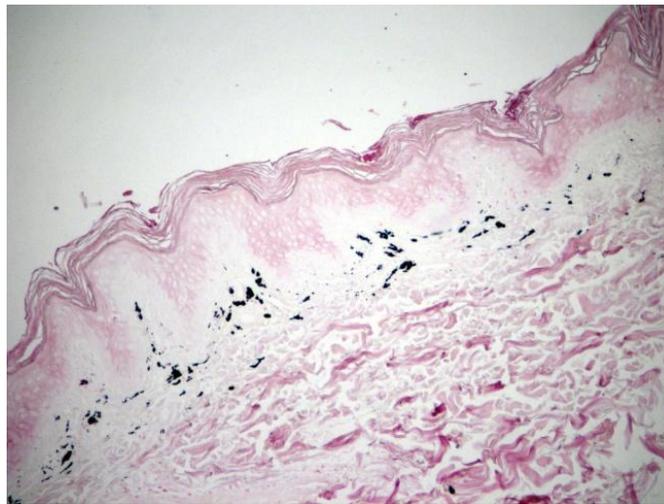


Figura 8. Incontinência pigmentar (FM x200)

4.3. Avaliação histológica comparativa (grupo 1 e 2)

Os achados histológicos epidérmicos e dérmicos comparativos entre os pacientes do grupo 1 (lúpus) e 2 (vitiligo) estão apresentados na tabela I.

Tabela I: Achados histológicos dos pacientes dos grupos 1 (lúpus) 2 (vitiligo)

| EPIDERME | GRUPO 1 (LÚPUS) | GRUPO 2 (VITILIGO) | p (Fisher) |
|---------------------------|----------------------------|-------------------------------|-------------------|
| Hiperkeratose | 8/12 (66,7%) | 7/12 (58,3%) | 1,000 |
| Retificação | 7/12 (58,3%) | 1/12 (8,3%) | 0,027 |
| Rolhas foliculares | 2/12 (16,7%) | 0/12 | 0,478 |
| Degeneração vacuolar ZMB | 4/12 (33,3%) | 0/12 | 0,093 |
| Ceratinócitos apoptóticos | 6/12 (50%) | 0/12 | 0,014 |
| Espessamento ZMB | 8/12 (66,7%) | 1/12 (8,3%) | 0,009 |
| DERME | GRUPO 1 (LÚPUS) | GRUPO 2 (VITILIGO) | p (Fisher) |
| Corpos colóides | 3/12 (25%) | 0/12 | 0,217 |
| Incontinência pigmentar | 4/12 (33,3%) | 2/12 (16,7%) | 0,640 |
| Infiltrado inflamatório | 9/12 (75%) | 8/12 (66,7%) | 1,000 |
| Elastose | 6/12 (50%) | 3/12 (25%) | 0,400 |
| Fibrose | 5/12 (41,7%) | 0/12 | 0,037 |
| Ectasia vascular | 6/12 (50%) | 2/12 (16,7%) | 0,193 |
| Depósito de mucina | 0/12 | 0/12 | 1,000 |

As alterações histológicas encontradas no grupo 2 foram muito discretas. Entre elas, a hiperkeratose e a presença de infiltrado inflamatório foram as mais frequentes. A hiperkeratose foi leve e descrita em sete casos (58,3%). O infiltrado inflamatório, linfocitário, foi encontrado em oito pacientes (66,7%), apresentando disposição perivascular/perianexial e localização superficial. Em um caso, o infiltrado assumiu padrão focalmente liquenóide (figura 9, p.68). Em relação ao grupo 1, não houve diferença estatística quanto a esses dois achados histológicos ($p=1,00$). Apesar da maioria das lâminas do grupo 2 apresentarem epiderme sem retificação de cones epiteliais, a espessura da camada de Malpighi

não demonstrou diferença estatística entre os grupos 1 e 2 ($59,3 \times 10^{-3}/\text{mm} \pm 14$ para o grupo 2; $p=0,193$).

Em relação às características histológicas sugestivas de lúpus, o espessamento da ZMB e a presença de ceratinócitos apoptóticos na epiderme apresentaram diferenças estatísticas entre os grupos 1 e 2 ($p=0,009$ e $p=0,014$, respectivamente). Alterações degenerativas da derme, como telangectasias e elastose foram encontradas, respectivamente, em dois (16,7%) e três (25%) pacientes do grupo 2, mas não houve diferença estatística em relação ao grupo 1. Nenhum paciente com vitiligo apresentou fibrose dérmica e esse achado foi estatisticamente significativo em relação ao grupo de pacientes lúpicos ($p=0,037$).

Em relação à contagem de melanócitos pelo HMB45 e Melan-A, não houve diferença estatística entre os grupos 1 e 2 ($p=0,362$ e $p=0,382$ respectivamente), como evidenciado pelo quadro VI e figuras 10 (p.68) e 11(p.69):

Quadro VI: Contagem de melanócitos pelo HMB45 e MelanA nos grupos 1 e 2

| Grupo 1 (Lúpus) | | | Grupo 2 (Vitiligo) | | |
|-----------------|------------|------------|--------------------|------------|------------|
| Caso | HMB45 | Melan-A | Caso | HMB45 | Melan-A |
| 1 | Negativo | Negativo | 1 | Negativo | Negativo |
| 2 | Negativo | Negativo | 2 | 2,34mel/mm | 2,34mel/mm |
| 3 | Negativo | Negativo | 3 | Negativo | Negativo |
| 4 | Negativo | Negativo | 4 | Negativo | Negativo |
| 5 | 3,05mel/mm | 3,61mel/mm | 5 | Negativo | Negativo |
| 6 | 2,23mel/mm | 3,47mel/mm | 6 | 0,93mel/mm | 2,4mel/mm |
| 7 | Negativo | Negativo | 7 | Negativo | Negativo |
| 8 | 2,14mel/mm | 6,3mel/mm | 8 | Negativo | Negativo |
| 9 | Negativo | Negativo | 9 | 0,1mel/mm | 2,08mel/mm |
| 10 | 3,84mel/mm | 5,85mel/mm | 10 | Negativo | 0,54mel/mm |
| 11 | 2,13mel/mm | 3,59mel/mm | 11 | Negativo | Negativo |
| 12 | Negativo | Negativo | 12 | Negativo | Negativo |

mel/mm: melanócito por milímetro de epiderme

Em relação ao grupo controle, tanto o grupo 1 quanto o grupo 2 apresentaram diferença estatística para a contagem de melanócitos pelo HMB45 e pelo Melan-A, conforme evidencia o gráfico I.

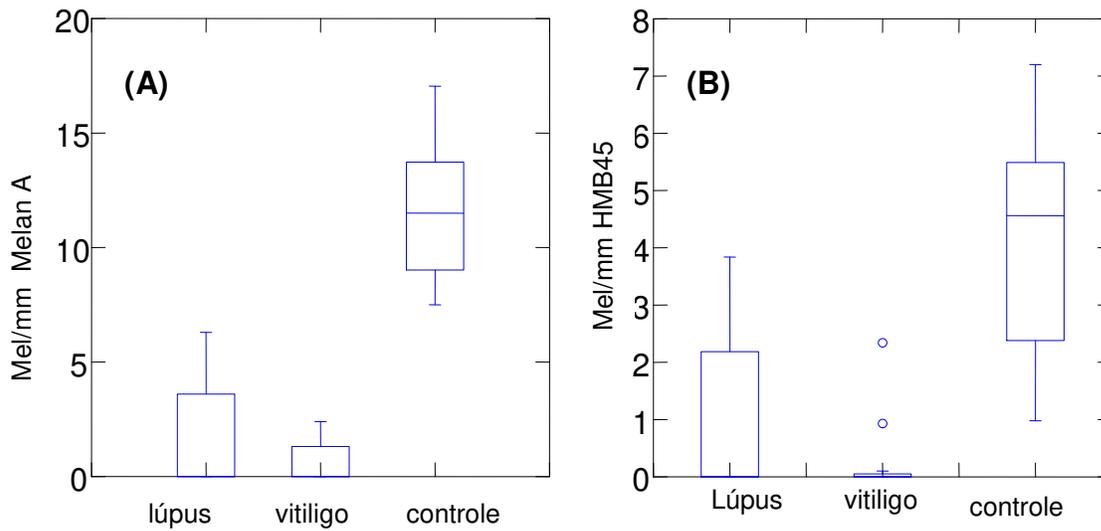


Gráfico I. Box-and-whiskers-plots com a contagem de melanócitos/mm nos pacientes com lúpus, vitiligo e controles pelo anticorpo Melan A (A) e HMB45 (B).

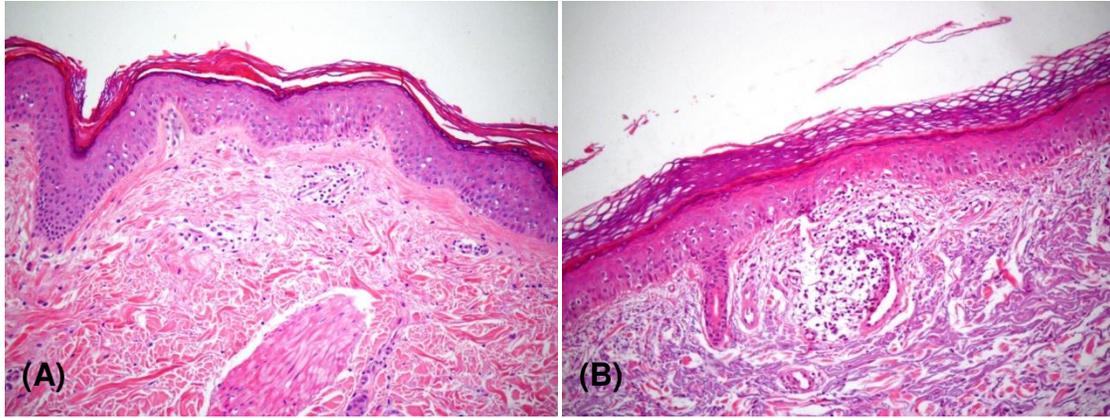


Figura 9. Vitiligo. Infiltrado inflamatório leve (A) e liquenóide (B) (H&E x200)

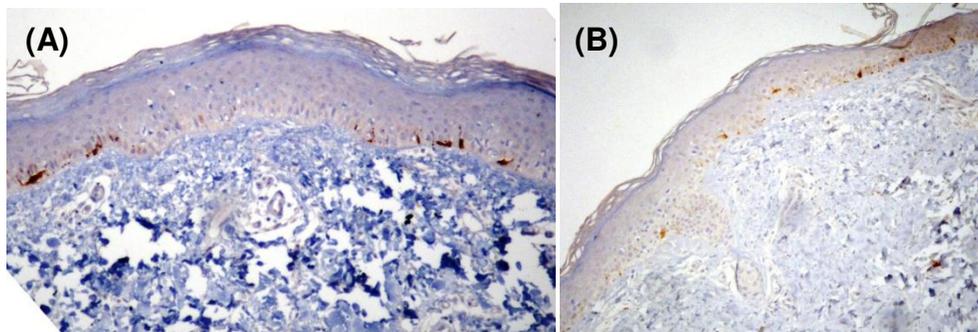


Figura 10. Imunohistoquímica pelo HMB45 no vitiligo (A) (x200) e no lúpus (B) (x100).

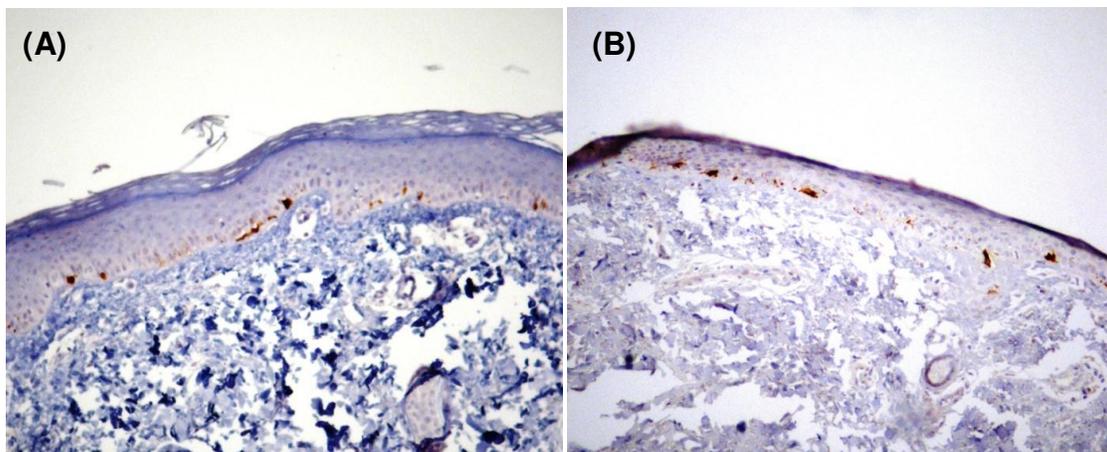


Figura11. Imunohistoquímica pelo Melan-A no vitiligo (A) e no lúpus (B) (x200).
O número de melanócitos está marcadamente diminuído em ambas as lâminas.

5 – DISCUSSÃO

Apesar dos achados histológicos do LEC serem extensivamente descritos, não havia nenhum estudo especificamente devotado às lesões vitiligóides nessa dermatose. Isso se deve provavelmente à baixa frequência dessas lesões no lúpus, como sugerido pelo presente estudo, e ao caráter transitório que elas podem apresentar durante a evolução da doença. Ainda assim, os autores acreditam que as lesões vitiligóides no lúpus foram subestimadas, pois não foram incluídos no estudo os pacientes com lesões acrômicas sem diagnóstico comprovado nem aqueles que possuíam diagnóstico clínico de lúpus sem comprovação histológica. As lesões vitiligóides não diferiram das lesões típicas do lúpus quanto à ocorrência preferencial no sexo feminino e à localização nas áreas fotoexpostas. (1,42,43). Não houve preferência por nenhuma das formas clínicas do lúpus cutâneo. A evolução desses pacientes também seguiu a descrição na literatura para o LEC.

O diagnóstico de LEC é estabelecido com base em uma combinação de alterações histológicas, que podem ser aparentes em todos os níveis da pele. Os principais achados histológicos que permitem o diagnóstico são a hiperqueratose com rolhas córneas foliculares (para o LECD), a atrofia da camada de Malpighi, o infiltrado inflamatório de intensidade variável, a degeneração vacuolar das células da camada basal e o espessamento da ZMB (44). Por ordem de frequência, as alterações histológicas mais encontradas nos casos estudados foram o infiltrado inflamatório (75%), a hiperqueratose (66,7%), o espessamento da ZMB (66,7%), a retificação da epiderme (58,3%), os ceratinócitos apoptóticos epidérmicos (50%), a ectasia vascular e a elastose dérmica (50%). A degeneração vacuolar das células da ZMB, também conhecida como degeneração hidrópica, foi

encontrada em apenas 33,3% das amostras, mas estava presente nos quatro doentes em que foi possível confirmar o diagnóstico histológico de lúpus. Isso é condizente com a observação de Winfield e Jaworsky (8) de que a degeneração hidrópica da zona da membrana basal é a alteração histológica mais importante para o diagnóstico de LE. Bangert et al (45), no entanto, relataram que no LECSA a degeneração vacuolar é muitas vezes focal e pode não ocorrer em 25% dos casos.

As alterações epidérmicas variam conforme a característica clínica das lesões. Isso é observado, por exemplo, no lúpus tímido, que se apresenta clinicamente por placas infiltradas sem atrofia que, histologicamente, apresentam pouca ou nenhuma alteração epidérmica (46). Segundo Bielicky e Trapl (47), nas lesões que clinicamente não apresentam escamas aderentes ou tampões ceratóticos foliculares, a epiderme pode mostrar alterações muito discretas e, em particular, nenhuma degeneração hidrópica basal. Isso justifica o que aconteceu na maioria dos casos estudados, visto que para seleção das lesões vitiligóides a pele afetada não apresentava sinais clínicos de atrofia, descamação ou eritema.

O infiltrado inflamatório no lúpus pode ser encontrado ao longo da junção dermo-epidérmica, ao redor dos folículos pilosos e outros apêndices. A presença de infiltrado inflamatório em faixa, corpos colóides e incontidência pigmentar tornam o LE, juntamente com o líquen plano, protótipo de dermatite de interface (48). No presente estudo, apesar da localização liquenóide do infiltrado inflamatório ter sido observada em apenas dois pacientes, a presença de ceratinócitos apoptóticos na epiderme e na derme são indicativos da presença de uma reação liquenóide prévia.

A degeneração basofílica do colágeno é um achado frequente nas lesões lúpicas, consistente com o acometimento da pele fotoexposta caracteristicamente encontrada nesta dermatose. Schmitt et al (49) demonstraram, ultraestruturalmente, que as lesões do LE têm fibras elásticas com alterações próprias, ou seja, diferentes das da elastose solar, sugerindo haver um dano específico às fibras elásticas no decorrer do processo evolutivo lúpico. Adicionalmente à exposição solar e a fatores intrínsecos voltados às fibras elásticas, a ausência de melanócitos e de melanina pode ter contribuído para as alterações degenerativas dérmicas nos pacientes estudados. A localização da fibrose próxima à epiderme e superficialmente ao material elastótico sugere a ocorrência de um processo regenerativo dérmico. Isso indica que as lesões vitiligóides são, pelo menos em parte, resultado de um processo cicatricial e não uma manifestação cutânea ativa. Dessa forma, elas só poderiam suceder as lesões discóides ou subagudas do LE.

Apesar da acromia das lesões, foi possível encontrar melanócitos pelos métodos imunohistoquímicos em cinco dos 12 pacientes estudados. É sabido que os anticorpos monoclonais HMB45 e Melan-A são marcadores específicos da linhagem melanocítica (40,50). A avaliação com esses anticorpos é mais sensível que os métodos de coloração convencionais, como o H&E, e mais específica do que a proteína S100 (37,51). O anticorpo Melan-A mostrou-se mais sensível na detecção de melanócitos que o HMB45. Para Shidham et al (52), a detecção de micrometástases de melanoma pelo Melan-A revelou uma marcada imunoreatividade citoplasmática, permitindo uma alta acurácia no reconhecimento do melanócito. Orosz (41) observou que o Melan-A também reage com os

melanócitos de nevos intradérmicos, nevos compostos, nevos atípicos e nevos de Spitz/Reed, apesar de ser útil na diferenciação com tumores que “imitam” melanoma maligno. O HMB45 não corou nevos intradérmicos nem o componente dérmico de nevos compostos. A positividade para o HMB45 indica melanogênese ativa, podendo estar presente em melanócitos adultos normais estimulados (38). Nos pacientes estudados, os dois anticorpos se comportaram de modo já descrito, com uma maior positividade e maior intensidade na coloração para o Melan-A em detrimento do HMB45. No entanto, a positividade do HMB45 nas lesões acrómicas demonstra a presença de melanócitos funcionais, a partir dos quais pode haver uma repigmentação dessas lesões. A imunoreatividade pelo HMB45 já foi descrita para outras dermatoses acrómicas, como o líquen escleroso e atrófico (53) embora Le Poole et al (12) não tenham evidenciado melanócitos usando esse anticorpo em casos de vitiligo.

Nas dermatoses caracterizadas por degeneração hidrópica das células da camada basal e infiltrado liquenóide, existe um ataque e destruição dos melanócitos. Esse fato deve ser o responsável pela acromia nas lesões vitiligóides do LE, já que não foram evidenciados melanócitos na maioria das amostras pelos métodos imunohistoquímicos. Nos casos com melanócitos marcados pelos anticorpos HMB45 e Melan-A, a melanina nos ceratinócitos epidérmicos evidenciada através da coloração de FM demonstrou que tanto a produção do pigmento quanto a sua transferência dos melanócitos para os ceratinócitos não estavam comprometidas.

Estudos comparativos entre o vitiligo e outros distúrbios acrômicos foram descritos na literatura (53,35). Havia apenas um trabalho que comparou, através de métodos imunológicos, histológicos e histoquímicos, o vitiligo e o lúpus eritematoso vitiligóide. Souza Filho et al (54) investigaram os anticorpos antimelanócitos no vitiligo, no nevo halo e no LE vitiligóide, assim como a avaliaram a atividade NK de linfócitos periféricos contra células de melanoma nesses grupos e a análise histoquímica da melanina e dos melanócitos. Os autores não avaliaram os aspectos histológicos epidérmicos e dérmicos das lesões, nem utilizaram anticorpos monoclonais específicos da linhagem melanocítica. O presente trabalho foi o único a fazer essa análise entre o vitiligo e as lesões vitiligóides do LE.

Na maioria dos pacientes com vitiligo, o diagnóstico é realizado através da avaliação clínica das lesões, sendo o exame histopatológico raramente necessário. O infiltrado inflamatório no vitiligo tem sido descrito em porcentagens variáveis (55). Hann et al (56), estudando 21 pacientes com vitiligo tricrômico, evidenciaram a presença de infiltrado inflamatório em 28,6% dos casos. Essa frequência aumentou à medida que se progrediu da área central despigmentada da lesão para a pele sã perilesional, onde as células inflamatórias foram encontradas em 76,2% das amostras estudadas. Já Gokhale e Mehta (57), encontraram células inflamatórias em 92% dos 74 pacientes estudados. Nos maiores grupos de pacientes, onde foram estudadas 100 e 210 amostras de pacientes com vitiligo, a ocorrência de infiltrado inflamatório dérmico variou de 41 a 54%, respectivamente (58,59). No presente estudo, o infiltrado inflamatório foi

encontrado em 66,7% dos casos de vitiligo, estando dentro do espectro descrito por outros autores.

A localização liquenóide do infiltrado inflamatório no vitiligo foi descrita por Panuncio e Vignale (60). Attili e Attili (59) encontraram uma dermatite de interface, com localização focal, em 29% dos pacientes pesquisados. Oliver et al (61), estudando 62 biópsias com laudo compatível com dermatite liquenóide, encontraram um caso de vitiligo. Sontheimer (62) descreveu o vitiligo como uma dermatose com reação liquenóide tecidual, visto poder apresentar características sutis de uma dermatite de interface. No presente estudo foi encontrado apenas um caso com infiltrado inflamatório focalmente liquenóide nas lesões cutâneas de vitiligo.

Outras alterações histológicas, presentes nas dermatites liquenóides, que estão diretamente relacionadas ao dano à camada basal são a degeneração vacuolar das células da ZMB, a presença de corpos colóides e a incontinência pigmentar. Hann et al (56) encontraram vacuolização das células basais em 23,8% dos casos de vitiligo, com porcentagem semelhante nos controles. Attili e Attili (59) descreveram alterações de interface pós-inflamatórias em 35% das amostras de vitiligo versus 15% da pele normal adjacente. No presente estudo, das três características histológicas citadas, apenas a incontinência pigmentar foi encontrada nos pacientes com vitiligo, embora sem diferença estatística entre os dois grupos. A presença de ceratinócitos apoptóticos epidérmicos foi significativamente maior nos pacientes com LE. Isso reforça a teoria do LE como exemplo de dermatose com reação liquenóide tecidual.

Segundo Gokhale e Mehta (57) as alterações inflamatórias são mais frequentemente encontradas nos casos de vitiligo de curta evolução e nos casos com progressão da doença. De modo semelhante, Sharquie et al (63) e Hann et al (56) encontraram células inflamatórias em quantidade maior nas bordas de lesões ativas do que em lesões estáveis de vitiligo. Segundo esses autores, a inflamação precede a perda de melanócitos na epiderme e biópsias de lesões completamente evoluídas de vitiligo não evidenciam grandes alterações inflamatórias. Isso pode justificar o fato de os achados histológicos nos pacientes com vitiligo do presente estudo terem sido discretos.

Nos casos de vitiligo de longa evolução, as alterações degenerativas são mais expressivas (57) e incluem atrofia epidérmica grosseira, fibrose dérmica e perda de apêndices, que foram descritas em até 7% dos pacientes (59). Nos casos estudados, não foi visto diferença estatística quanto à espessura da camada de Malpighi entre os dois grupos, embora nos pacientes lúpicos a epiderme se apresentasse retificada na maioria das amostras. Degeneração basofílica do colágeno e telangectasias estavam presentes em alguns casos de vitiligo, não apresentando diferença estatística com o LE. A fibrose dérmica, no entanto, foi um critério significativamente diferente entre os grupos, estando presente nos pacientes lúpicos, em especial naqueles com LECC, mas não nos casos de vitiligo.

Souza Filho et al (54) demonstraram a presença de anticorpos antimelanócitos por imunofluorescência indireta, utilizando células de melanoma como substrato, em 25% dos casos de vitiligo e nevo halo estudados e em 9% dos casos de lúpus vitiligóide. Eles não puderam excluir a possibilidade de que, no LE

com lesões vitiligóides, a despigmentação se devesse não somente à destruição inflamatória dos melanócitos, mas também a mecanismos de agressão melanocítica de caráter imunológico semelhantes aos que ocorrem no vitiligo e nevo halo.

No entanto, os achados histológicos do presente trabalho sugeriram que as lesões acrômicas no LE correspondem a lesões residuais, decorrentes de processo inflamatório liquenóide prévio. Isso reafirmou o que foi visto clinicamente, onde as lesões despigmentadas representam fases evolutivas possíveis a partir de lesões discóides ou subagudas clássicas. Como lesão residual, observou-se uma posterior regeneração, pelo menos parcial, da derme afetada pelo processo inflamatório através da formação de fibrose. Os achados histológicos clássicos do LE perderam-se em sua maioria, com exceção do espessamento da ZMB, alteração que ajuda no diagnóstico diferencial com o vitiligo. Apesar de terem sido encontradas alterações inflamatórias nos casos de vitiligo, esses achados não foram suficientes para classificá-lo como dermatite de interface de “baixo grau”, pelo menos quando se trata das lesões estáveis do vitiligo.

Smoller et al (38) e Abdallah et al (64) acreditaram que as lesões de vitiligo de longa data são caracterizadas pela ausência completa de melanina e melanócitos. LE Poole et al (12) conduziram um estudo imunohistoquímico usando um painel de 18 anticorpos antimelanócitos e concluíram que essas células estão ausentes nas lesões de vitiligo. No entanto, há relatos esporádicos referindo que as lesões de vitiligo não estariam completamente desprovidas de melanócitos. Tobin et al (65) isolaram, *in vitro*, melanócitos em todas as amostras de pele

despigmentada e normal, independente da duração da doença e do tratamento. Husain et al (66) também encontraram melanócitos epidérmicos e demonstraram a hidroxilação enzimática da tirosina em dopa. A melanina foi detectada nos ceratinócitos basais em lesões de vitiligo de 1 a 3 anos de evolução. Kim et al (58), estudando vitiligo e nevo despigmentoso, encontraram melanócitos em 12 de 100 pacientes com vitiligo, utilizando os anticorpos MART-1 e NKI/beteb. Os melanócitos estavam presentes mesmo nos casos de vitiligo com mais de 5 anos de duração. A estrutura do anticorpo MART-1 é a mesma do Melan-A, mas recebe essas duas designações porque o seu gene foi independentemente clonado por dois grupos de cientistas. Já o anticorpo NKI/beteb presumidamente reconhece o mesmo antígeno, a gp100, que o HMB45, porém em um diferente epítopo (67). Carlson et al (53), através de estudos comparativos entre o vitiligo e o líquen escleroso e atrófico, encontraram melanócitos marcados pelo MART-1 em seis dos nove casos de vitiligo, porém nenhum melanócito foi corado quando se utilizou o anticorpo HMB45. O presente estudo evidenciou a presença de melanócitos em, respectivamente, três e quatro amostras de vitiligo para os anticorpos HMB45 e Melan-A. A marcação pelo Melan-A corroborou com os achados mais recentes de que os melanócitos podem estar presentes nos casos de vitiligo estável. A positividade pelo HMB45, embora não descrita nos pacientes estudados por Carlson et al (53), sugeriu que alguns melanócitos remanescentes produzem pré-melanossomos, o que está em conformidade com Kim et al (58). Para confirmar essa hipótese, o ideal seria ampliar a amostragem dos casos de vitiligo.

Como não houve diferença estatística na contagem de melanócitos entre os dois anticorpos monoclonais para o grupo de pacientes com vitiligo e o grupo com LE, concluiu-se que não foi possível diferenciar as lesões vitiligóides das duas dermatoses pela presença ou ausência de melanócitos. Além disso, os autores acreditam ser possível a repigmentação em ambas as doenças devido a presença de melanogênese ativa comprovada pela positividade pelo HMB45.

Souza Filho et al (54) estudaram a melanina e os melanócitos na pele lesada de pacientes com vitiligo, nevo halo e LE vitiligóide e encontrou positividade em 88,23% dos casos utilizando a coloração histoquímica dopa adicionada a prata amoniacal (D+P), sem diferença estatística entre os grupos. Foi realizada também a investigação de melanócitos pela coloração imunohistoquímica com a proteína S100, que não se mostrou superior à D+P. Apesar de não terem sido utilizadas no presente trabalho as colorações D+P nem a proteína S100, os achados com os marcadores imunohistoquímicos específicos Melan A e HMB45 reafirmaram a existência de melanócitos no vitiligo e no LE com lesões vitiligóides descrita por Souza Filho et al.

6 – CONCLUSÕES

1. As lesões vitiligóides do LE não diferem das lesões típicas do lúpus quanto ao predomínio no sexo feminino e à predileção por áreas fotoexpostas. Não há preferência por nenhuma das formas clínicas do LEC e a evolução dos pacientes com lesões vitiligóides segue a descrição na literatura para o LEC.
2. Depreende-se a partir dos achados histológicos encontrados nas lesões vitiligóides do LE:
 - 2.1. As alterações epidérmicas variam conforme a característica clínica da lesão cutânea, justificando os poucos achados histológicos epidérmicos encontrados nas lesões vitiligóides do LE.
 - 2.2. A presença de ceratinócitos apoptóticos nas lesões vitiligóides evidencia e confirma o LE como uma dermatose liquenóide.
 - 2.3. As lesões vitiligóides do LE correspondem a lesões residuais, decorrentes de processo inflamatório liquenóide prévio.
3. Nem todas as lesões vitiligóides do LE apresentam características histológicas que permitem o diagnóstico de LE.
4. Os achados histológicos clássicos do LE perdem-se em sua maioria, com exceção do espessamento da zona da membrana basal, alteração que ajuda no diagnóstico diferencial com o vitiligo.
5. Apesar da acromia evidenciada clinicamente, melanócitos ainda podem ser encontrados nas lesões vitiligóides do LE.
6. Não é possível diferenciar as lesões vitiligóides do LE das lesões de vitiligo pela presença ou ausência de melanócitos através de métodos imunohistoquímicos. A positividade do anticorpo monoclonal HMB45 nas amostras de LE e vitiligo evidencia a presença de melanogênese ativa.

7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sontheimer RD. Lupus Erythematosus. In: Freedberg IM, Eisen AZ, Wolff K, Austen KF, Goldsmith LA, Katz SI et al, editors. Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine, 5th ed. International edition: McGraw-Hill; 1999. 1993-2009p.v2.
2. Albrecht J, Berlin JA, Braverman IM, Callen JP, Connolly MK, Costner MID et al. Dermatology position paper on the revision of the 1982 ACR criteria for systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2004; 13(11): 839-49.
3. Tebbe B, Orfanos CE. Epidemiology and socioeconomic impact of skin disease in lupus erythematosus. *Lupus* 1997; 6(2): 96-104.
4. Gilliam JN. The cutaneous signs of lupus erythematosus. *Continuing Education for the Family Physician* 1977; 6: 34-70.
5. Sontheimer HD. The lexicon of cutaneous lupus erythematosus – a review and personal perspective on the nomenclature and classification of the cutaneous manifestations of lupus erythematosus. *Lupus* 1997; 6(2):84-95.
6. Patel P, Werth V. Cutaneous lupus erythematosus: a review. *Dermatol Clin* 2002 Jul; 20 (3): 373-85.

7. Parodi A, Caproni M, Cardinali C, Bernacchi E, Fuligni A, De Panfilis G et al. Clinical, histological and immunopathological features of 58 patients with subacute cutaneous lupus erythematosus: a review by the Italian group of immunodermatology. *Dermatology* 2000; 200(1): 6-10.
8. Winfield H, Jaworsky C. Connective Tissue Diseases. In Elder DE. *Lever's Histopathology of the Skin*, 10^o ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2009. 279 – 310.
9. Sontheimer RD. Subacute cutaneous lupus erythematosus: a decade's perspective. *Med Clin North Am* 1989 Sep; 73(5): 1073-90.
10. Walsh DS, Farley MF, Beard JS, Sau P, Tesar J, James WD. Systemic lupus erythematosus: nephritis, dilated cardiomyopathy, and extensive cutaneous depigmentation responsive to hydroxychloroquine. *J Am Acad Dermatol* 1995 Nov; 33(5 Pt1): 828-30.
11. Galadari E, Mehregan AH, Hashimoto K. Ultrastructural study of vitiligo. *Int J Dermatol* 1993 Apr; 32(4): 269-271.
12. Le Poole IC, van den Wijngaard RM, Westerhof W, Dutrieux RP, Das PK. Presence or absence of melanocytes in vitiligo lesions: an immunohistochemical investigation. *J Invest Dermatol* 1993 Jun; 100(6): 816-22.

13. Ongenaes K, Van Geel N, Naeyaert JM. Evidence for an Autoimmune Pathogenesis of Vitiligo. *Pigment Cell Res*, 2003 Apr; 16(2): 90-100.
14. Bystryn JC. Immune Mechanisms in Vitiligo. *Clin Dermatol*, 1997 Nov-Dec; 15(6): 853-61.
15. Grunnett I, Howitz J, Reymann F, Schwartz M. Vitiligo and pernicious anemia. *Arch Dermatol* 1970 Jan; 101(1): 82-5.
16. Cunliffe WJ, Hall R, Newell DJ, Stevenson CJ. Vitiligo, thyroid disease and autoimmunity. *Br J Dermatol* 1968 Mar; 80(3): 135-9.
17. Callen JP. Discoid lupus erythematosus in a patient with vitiligo and autoimmune thyroiditis. *Int J Dermatol* 1984 Apr; 23(3): 203 – 4.
18. Naughton GK, Eisinger M, Bystryn JC, Antibodies to normal human melanocytes in vitiligo. *J Exp Med* 1983 Jul; 158(1): 246-51.
19. Bystryn JC, Naughton GK. The significance of vitiligo antibodies. *J Dermatol* 1985 Feb; 12(1): 1-9.
20. Al'Abadie MS, Warren MA, Bleehen SS, Gawkrödger DJ. Morphologic observations on the dermal nerves in vitiligo: an ultrastructural study. *Int J Dermatol* 1995 Dec; 34(2): 837-40.

21. Castanet J, Ortonne JP. Pathophysiology of Vitiligo. Clin Dermatol, 1997 Nov-Dec; 15(6): 845-51.
22. Pawelek J, Korner A, Bergstrom A, Bologna J. New regulators of melanin biosynthesis and the autodestruction of melanoma cells. Nature 1980 Aug; 286 (5773): 617-9.
23. Moellman G, Klein-Angerer S, Scollay DA, Nordlund JJ, Lerner AB. Extracellular granular material and degeneration of keratinocytes in the normally pigmented epidermis of patients with vitiligo. J Invest Dermatol 1982 Nov; 79(5): 321-30.
24. Ortonne JP, Mosher DB, Fitzpatrick TB. Approach to the problem of leukoderma. In: Ortonne J-P, Mosher DB, Fitzpatrick TB, editors. Vitiligo and other hypomelanoses of hair and skin. New York: Plenum, 1983: 37- 56.
25. Le Poole IC, Das PK, van den Wijngaard RM, Bos JD, Weterhof W. Review of ethiopathomechanism of vitiligo: a convergence Theory. Exp Dermatol 1993 Aug; 2(4): 145-53.
26. Khare AK, Singh G, Pandey SS. Vitiligo and disseminated discoid lupus erythematosus. Indian J Dermatol. 1988 Jul;33(3):37-9.
27. Forestier JY, Ortonne JP, Thivolet J, Souteyrand P. Lupus érythémateux et vitiligo. Ann Dermatol Venereol 1981; 108(1): 33-8.

28. Gul U, Kiliç A, Tulunay O, Kaygusuz G. Vitiligo associated with malignant melanoma and lupus erythematosus. *J Dermatol* 2007 Feb; 34(2): 142 – 5.
29. Chan KF, Kong KH, Boey ML. "Great mimicry" in a patient with tetraparesis: a case report. *Arch Phys Med Rehabil* 1995 Apr; 76(4):391-3.
30. Bologna JL, Pawelek JM. Biology of hypopigmentation. *J Am Acad Dermatol* 1988 Aug; 19(2 Pt 1): 217-55.
31. Clayton R, Breathnach A, Martin B, Feiwel M. Hypopigmented sarcoidosis in the negro. Report of eight cases with ultrastructural observations. *Br J Dermatol* 1977 Feb; 96(2): 119-25.
32. Cornelius CE, Stein KM, Hanshaw WJ, Spott DA. Hypopigmentation and sarcoidosis. *Arch Dermatol* 1973 Aug; 108(2): 249-51.
33. Nayar A, Job CK. A study of epidermal melanocytes in hypopigmented patches of leprosy. *Indian J Med Res* 1970 Feb; 58(2): 187-93.
34. Sehgal VN. Hypopigmented lesions in leprosy. *Br J Dermatol* 1973; 89: 99-100.

35. Klaus SN. The biologic basis of eight unusual hypopigmentary disorders. *Ala J Med Sci* 1979 Oct; 16(4): 290 – 304.
36. Breathnach SM, McKee PH, Smith NP. Hypopigmented mycosis fungoides: report of five cases with ultrastructural observations. *Br J Dermatol* 1982 Jun; 106(6): 643-9.
37. Heegaard S, Jensen OA, Prause JU. Immunohistochemical diagnosis of malignant melanoma of the conjunctiva and uvea: comparison of the novel antibody against melan-A with S100 protein and HMB45. *Melanoma Res* 2000 Aug; 10(4): 350-4.
38. Smoller BR, McNutt NS, Hsu A. HMB-45 recognizes stimulated melanocytes. *J Cutan Pathol* 1989 Apr; 16(2): 49-53.
39. Skelton HG 3rd, Smith KJ, Barrett TL, Lupton GP, Graham JH. HMB-45 staining in benign and malignant melanocytic lesions. A reflection of cellular activation. *Am J Dermatopathol* 1991 Dec; 13(6): 543-50.
40. Jungbluth AA, Busam KJ, Gerald WL, Stockert E, Coplan KA, Iversen K et al. A103: an anti-Melan-A monoclonal antibody for the detection of malignant melanoma in paraffin-embedded tissues. *Am J Surg Pathol* 1998 May; 22(5): 595-602.

41. Orosz Z. Melan-A/Mart-1 expression in various melanocytic lesions and in non-melanocytic soft tissue tumours. *Histopathology* 1999 Jun; 34(6): 517-25.
42. Sontheimer RD, Provost TT. Cutaneous manifestations of lupus erythematosus. In: Wallace DJ, Hahn BH, editors. *Dubois' Lupus Erythematosus*, 5th ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1997. 569.
43. Duarte AA. *Colagenoses e a Dermatologia*. São Paulo: edição do autor, 2004. 148p.
44. David-Bajar KM, Davis BM. Pathology, immunopathology, and immunohistochemistry in cutaneous lupus erythematosus. *Lupus* 1997; 6(2): 145-57.
45. Bangert JL, Freeman RG, Sontheimer RD, Gilliam JN. Subacute cutaneous lupus erythematosus and discoid lupus erythematosus: comparative histopathologic findings. *Arch Dermatol* 1984 Mar; 120(3): 332-7.
46. Ruiz H, Sánchez JL. Tumid lupus erythematosus. *Am J Dermatopathol* 1999 Aug; 21(4): 356-60.
47. Bielicky T, Trapl J. Noncicatricial chronic erythematosus. *Arch Klin Exp Dermatol* 1963 Oct; 217: 438-56.

48. Pinkus H. Lichenoid tissue reactions: a speculative review of the clinical spectrum of epidermal basal cell damage with special reference to erythema dyschromicum perstans. *Arch Dermatol* 1973 Jun; 107(6): 840-6.
49. Schmitt D; Thivolet J, Perrot H. Ultrastructural study of the cutaneous elastic fibres in lupus erythematosus. *Br J Dermatol* 1972 Oct; 87(4): 355-60.
50. Gown AM, Vogel AM, Hoak D, Gough F, McNutt MA.. Monoclonal antibodies specific for melanocytic tumors distinguish subpopulations of melanocytes. *Am J Pathol* 1986 May; 123(2): 195-203.
51. Blessing K, Sanders DS, Grant JJ. Comparison of immunohistochemical staining of the novel antibody melan-A with S100 protein and HMB-45 in malignant melanoma and melanoma variants. *Histopathology* 1998 Feb; 32(2): 139-46.
52. Shidham VB, Qi DY, Acker S, Kampalath B, Chang CC, George V et al. Evaluation of micrometastases in sentinel lymph nodes of cutaneous melanoma: higher diagnostic accuracy with Melan-A and MART-1 compared with S-100 protein and HMB-45. *Am J Surg Pathol* 2001 Aug; 25(8): 1039-46.

53. Carlson JA, Grabowski R, Mu XC, Del Rosario A, Malfetano J, Slominski A. Possible mechanisms of hypopigmentation in lichen sclerosus. *Am J Dermatopathol* 2002 Apr; 24(2): 97-107.
54. Souza Filho LGC, Rivitti EA, Miyauchi LM, Sotto MN, Maria DA, Puejo SST et al. Estudo comparativo entre vitiligo, nevo halo e lúpus eritematoso vitiligóide por meio de métodos imunológicos, histológicos e imuno-histoquímicos. *An Bras Dermatol* 2005 Mar-Apr; 80(2): 143-8.
55. Montes LF, Abulafia J, Wilborn WH, Hyde BM, Montes CM. Value of histopathology in vitiligo. *Int J Dermatol* 2003 Jan; 42(1): 57-61.
56. Hann SK, Kim YS, Yoo JH, Chun YS. Clinical and histopathologic characteristics of trichrome vitiligo. *J Am Acad Dermatol* 2000 Apr; 42(4): 589-96.
57. Gokhale BB, Mehta LN. Histopathology of vitiliginous skin. *Int J Dermatol* 1983 Oct; 22(8): 477-80.
58. Kim YC, Kim YJ, Kang HY, Sohn S, Lee ES. Histopathologic features in vitiligo. *Am J Dermatopathol* 2008 Apr; 30 (2): 112-6.
59. Attili VR, Attili SK. Lichenoid inflammation in vitiligo – a clinical and histopathologic review of 210 cases. *Int J Dermatol* 2008 Jul; 47(7): 663-9.

60. Panuncio AL, Vignale R. Ultrastructural Studies in Stable Vitiligo. Am J Dermatopathol, 2003 Feb; 25(1): 16-20.
61. Oliver GF, Winkelmann RK, Muller SA. Lichenoid dermatitis: A clinicopathologic and immunopathologic review of sixty-two cases. J Am Acad Dermatol 1989 Aug; 21(2 Pt1): 284-92.
62. Sontheimer RD. Lichenoid Tissue Reaction/Interface Dermatitis: Clinical and Histological Perspectives. J Invest Dermatol 2009 May; 129(5): 1088-99.
63. Sharquie KE, Mehenna SH, Naji AA, Al-Azzawi H. Inflammatory changes in vitiligo. Stage I and stage II of depigmentation. Am J Dermatopathol 2004 Apr; 26 (2): 108-12.
64. Abdallah M, Abdel-Naser MB, Moussa MH, Assaf C, Orfanos CE. Sequential immunohistochemical study of depigmenting and repigmenting minigrafts in vitiligo. Eur J Dermatol 2003 Nov-Dec; 13(6): 548-52.
65. Tobin DJ, Swanson NN, Pittelkow MR, Peters EM, Schallreuter KU. Melanocytes are not absent in lesional skin of long duration vitiligo. J Pathol 2000 Aug; 191(4):407-16.
66. Husain I, Vijayan E, Ramaiah A, Pasricha JS, Madan NC. Demonstration of tyrosinase in vitiligo skin of human beings by sensitive fluorometric method

as well as by ^{14}C (U)-L-tyrosine incorporation into melanin. *J Invest Dermatol* 1982 Mar; 78(3): 243-52.

67. Schaumburg-Lever G, Metzler G, Kaiserling E. Ultrastructural localization of HMB-45 binding sites. *J Cutan Pathol* 1991 Dec; 18(6): 432-5.

8 -ANEXOS

Histopathology and immunohistochemistry of depigmented lesions in lupus erythematosus

Background: Depigmented lesions (DL) have been described in areas previously damaged by inflammation in lupus erythematosus (LE). In the absence of typical lesions, distinction with other achromic diseases might be challenging. We studied the histological features and the behavior of melanocytes in these lesions.

Methods: Tissue sections of 12 patients with lupus and DL were stained with hematoxylin-eosin, periodic acid-Schiff and Fontana-Masson. Melanocytes were counted by immunohistochemistry methods using Melan A and HMB-45. Ten biopsies of normal skin were used as controls.

Results: The most common histological findings were: cellular infiltration (75%); hyperkeratosis (66.7%); thickening of basement membrane (66.7%); thinning and flattening of the epidermis (58.3%) and degenerative changes in collagen fibers (50%). Epidermal melanin and melanocytes were found in 41.7%. The melanocyte counts by HMB-45 and Melan A were significantly lower than in normal skin.

Conclusions: The DL still fulfill histological criteria for lupus. In the absence of a precise histological diagnosis, thickening of basement membrane, hyperkeratosis, cellular infiltration, epidermal atrophy and elastosis are the most common features. Loss of melanocytes and the dermal fibrosis suggests that DL in cutaneous LE behave as post-inflammatory scars.

França AFEC, de Souza EM. Histopathology and immunohistochemistry of depigmented lesions in lupus erythematosus. J Cutan Pathol 2010; 37: 559–564. © 2009 John Wiley & Sons A/S.

Andrea Fernandes Eloy da Costa França and Elemir Macedo de Souza

Department of Dermatology, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil

Andrea F Eloy da Costa França, MD,
Department of Dermatology, University of
Campinas (UNICAMP), Rua Alexander Fleming
40, Caixa Postal 6111, Barão Geraldo, CEP
13083-970, Campinas, SP, Brazil
Tel: +55 19 3521 7602
Fax: +55 19 3521 4107
e-mail: andreaeloy@uol.com.br

Accepted for publication August 30, 2009

Lupus erythematosus (LE) is an autoimmune disorder that affects multiple organs and systems, including the skin. Gilliam created in 1977 a classification scheme for cutaneous lesions associated with LE based on clinical and histological appearance.¹ He subdivided skin disease into LE-specific (cutaneous LE) and LE-nonspecific. Cutaneous LE may be further divided into acute, subacute and chronic subtypes. Acute cutaneous lupus (ACLE) is characterized by malar rash described in association with systemic disease. Subacute lupus (SCLE) usually presents as

papulosquamous or annular lesions. Discoid plaques are the hallmark of chronic cutaneous lupus (CCLE). Cutaneous LE is two to three times as frequent as systemic LE, thus representing an important subcategory of the disease.²

Depigmented lesions (DL) have been described in both SCLE and CCLE. It seems that these are chronic lesions that appear in areas previously damaged by inflammatory activity. Some authors suggest that DL in LE might resemble those found in other diseases, especially vitiligo.³ On clinical

França & de Souza

grounds, distinction of DL in LE and vitiligo may be challenging, notably in the absence of typical discoid or subacute lesions. Association between the two disorders was already described.^{4,5} Despite this, there are few systematic studies addressing DL in LE, including its histopathological profile. Therefore, we designed a study to estimate the frequency of DL in a large cohort of patients with LE, describe the histological features of DL in cutaneous LE and speculate about pathogenetic mechanisms underlying these lesions. We analyzed changes of the epidermis and dermis using hematoxylin-eosin (HE) sections and other histochemical stains in patients with DL-LE. Melanocyte counts in the lesions were also evaluated by immunohistochemistry methods.

Material and methods

Subjects' selection

In a group of 220 patients with LE followed at the Dermatology Outpatient Clinic of the University Hospital at University of Campinas (UNICAMP) from 2005 to 2008, we identified 12 patients with DL. All 12 patients were previously diagnosed as cutaneous LE by skin biopsy of a discoid or subacute lesion. The DL did not show atrophy, scaling or erythema on visual inspection (Fig. 1). Patients without a confirmatory histological diagnosis of LE and those presenting cutaneous LE in association with other immunological diseases, including vitiligo, were excluded. Five-millimeter punch biopsies of DL were then performed, and specimens were stained with HE, periodic acid-Schiff (PAS), ammoniated silver nitrate (Fontana-Masson), Alcian Blue reaction and for immunohistochemical stains.

Histological analysis

The following features were reported on histological specimens: hyperkeratosis, thinning and flattening of the stratum malpighii; follicular plugging, vacuolar degeneration of basal cells; presence of apoptotic keratinocytes; thickening of basement membrane (by PAS); melanin content (by Fontana-Masson); inflammatory cell infiltration; presence of melanophages (by Fontana-Masson); mucin deposition (by Alcian Blue), and degenerative changes in dermis.

Thickening of basement membrane was considered continuous when present in at least half of the fields on $\times 400$ amplification. Inflammatory infiltrate was classified as mild, moderate or dense according to the inflammatory cell count around appendages and vessels. Pigment incontinence was classified as continuous when at least half of the fields on $\times 200$ amplification were abnormal.

Immunohistochemistry stains against HMB-45 (at 1:100 ratio; DAKO A/S[®], Glostrup, Denmark) and Melan A (at 1:300 ratio; DAKO A/S[®], Glostrup, Denmark) were performed to show the presence of melanocytes. Melanocytes were counted per 8 fields of $\times 400$. Ten specimens of normal skin from healthy individuals also stained by HMB-45 and Melan A were used as controls.

Statistical analysis

Statistical analysis was carried out with SYSTAT 10.2 software package. Fisher exact test and Mann-Whitney U test were used to compare groups. Differences were considered significant when $p < 0.05$.

Results

Clinical data

Clinical findings are depicted in Table 1. DL were found in 5% of the cohort of patients with LE (12/220). There were 9 women and 3 men, with ages varying from 18 to 62 years old when first examined. Mean duration of disease was 10.3 years. Seven patients (58.3%) had CCLE and five (41.7%) had SCLE. Of the patients with CCLE, two had

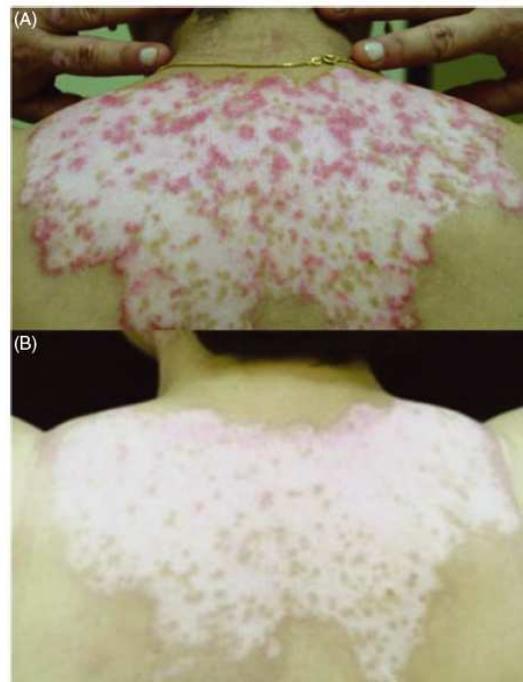


Fig. 1. Depigmented lesions in lupus erythematosus (LE) during activity (A) and inactivity (B) of the disease.

Depigmented lesions in lupus

Table 1. Clinical features of the LE patients with depigmented lesions

| Case | Diagnosis | Sex | Race | Age | Duration of disease | Site of lesion | Laboratory |
|------|-----------|-----|------|-----|---------------------|----------------|-----------------------------------|
| 1 | CACLE | F | C | 41 | 28 | Sun exposed | Negative |
| 2 | CACLE | F | c | 50 | 18 | Sun exposed | Negative |
| 3 | CACLE | F | C | 57 | 8 | Sun exposed | Negative |
| 4 | CACLE | F | C | 39 | 19 | Sun exposed | AAN 1/320 Leukopenia Lymphopenia |
| 5 | SCLE | M | C | 54 | 4 | Sun protected | AAN 1/160 lymphopenia |
| 6 | CACLE | F | C | 44 | 5 | Sun exposed | Negative |
| 7 | SCLE | F | C | 42 | 4 | Sun exposed | Negative |
| 8 | SCLE | F | C | 49 | 5 | Sun exposed | AAN 1/640 lymphopenia |
| 9 | CACLE | M | C | 49 | 5 | Sun exposed | AAN 1/160 Lymphopenia |
| 10 | SCLE | M | C | 18 | 3 | Sun exposed | AAN 1/160 lymphopenia proteinúria |
| 11 | CACLE | F | C | 44 | 12 | Sun exposed | AAN1/80 |
| 12 | SCLE | F | C | 62 | 13 | Sun exposed | Negative |

CACLE: chronic cutaneous lupus erythematosus; SCLE: subacute cutaneous lupus erythematosus; AAN: antinuclear antibody; LE: lupus erythematosus.

the hypertrophic/verrucous form and one had lupus panniculitis associated with discoid patches. Two out of the five SCLE patients evolved to systemic LE according to the American College of Rheumatology criteria. In the whole cohort, only one DL occurred on sun-protected skin (8.3%). Abnormal laboratory findings were described in six patients (50%) mostly consisting of positive antinuclear antibodies and lymphopenia.

Histopathologic findings

Histological features of the epidermis are described in Table 2. Regarding the stratum corneum, mild hyperkeratosis without parakeratosis was seen in eight (66.7%) patients. Thinning and flattening of the stratum malpighii, measured by less than five layers of keratinocytes overlying stratum basalis and absence of epidermal rete ridges were present in seven

patients (58.3%) (Fig. 2). Some of the characteristic histological changes of LE, like follicular plugging, vacuolar degeneration of the basal layer and thickening of basement membrane (by PAS) were found respectively, in two (16.7%); four (33.3%) and eight (66.7%) individuals. In two patients, involvement of basement membrane was focal. Damage to basal cells expressed by the presence of apoptotic keratinocytes was found in six (50%) of the specimens. In the dermis (Table 2), colloid bodies were seen in three (25%) patients. Nine (75%) patients presented a mild to moderate superficial lymphocytic infiltrate, predominantly around blood vessels and appendages. In two cases, the cell infiltration had a focal lichenoid localization. No mucin deposition was seen after Alcian Blue staining.

Degenerative changes found in the dermis included vascular ectasia and elastosis in six (50%) patients and fibrosis in five (41.7%). The

Table 2. Histological features of depigmented lesions in cutaneous lupus erythematosus

| Case | Epidermis | | | | | | Dermis | | | | | |
|------|----------------|---------|-----------------------|---------------------|-------------------------|------------------|----------------|-----------------|-----------|----------|------------------|------------------|
| | Hyperkeratosis | Atrophy | Vacuolar degeneration | Follicular plugging | Apoptotic keratinocytes | Thickening of BM | Colloid bodies | Cell infiltrate | Elastosis | Fibrosis | Vascular ectasia | Mucin deposition |
| 1 | Yes | Yes | No | No | No | No | Yes | No | Yes | Yes | Yes | No |
| 2 | Yes | Yes | No | No | No | Yes | No | Yes | Yes | Yes | Yes | No |
| 3 | No | No | No | No | Yes | No | No | Yes | No | No | No | No |
| 4 | Yes | Yes | Yes | Yes | Yes | Yes | No | No | Yes | Yes | No | No |
| 5 | Yes | Yes | No | No | No | Yes | No | Yes | No | No | No | No |
| 6 | Yes | No | No | Yes | Yes | Yes | No | Yes | No | No | No | No |
| 7 | No | Yes | Yes | No | No | Yes | No | Yes | No | No | Yes | No |
| 8 | No | No | No | No | Yes | Yes | No | Yes | No | Yes | No | No |
| 9 | Yes | No | No | Yes | No | yes | Yes | Yes | Yes | No | Yes | No |
| 10 | Yes | No | No | Yes | Yes | Yes | Yes | Yes | No | No | Yes | No |
| 11 | No | Yes | No | No | Yes | No | No | No | Yes | Yes | No | No |
| 12 | Yes | Yes | No | No | No | No | No | Yes | Yes | No | Yes | No |

França & de Souza

collagen fibers were coarsened and arranged horizontally above the elastotic material in most cases (Fig. 2). These findings were observed in all sun-exposed lesions. With regards to the subtypes of cutaneous lupus, there was no significant difference between SCLE and CCLE regarding the frequency of histological findings on HE ($p > 0.05$ for all variables).

Table (3) shows the findings regarding melanin content and melanocyte counts. The Fontana-Masson stain showed the presence of epidermal melanin granules in five (41.7%) and dermal melanophages in four (33.3%) patients. The melanin content had a heterogeneous arrangement and was restricted to basal keratinocytes in most cases. Three patients showed pigment incontinence in papillary dermis beneath basal melanin deposition (Fig. 3).

Melanocytes revealed by HMB-45 and anti-Melan A were only found in patients with positive Fontana-Masson staining (Figs. 4 and 5). Each sample that labeled positive by Melan A also labeled positive by HMB-45. Mean number of melanocytes on HMB-45 labeling was significantly lower in the whole cohort of patients than controls (4.3 ± 5.7 vs. 29.5 ± 17.4 , $p < 0.001$). Similar findings were found on Melan A labeling (7.1 ± 10.3 vs. 60.1 ± 24.9 , $p = 0.005$). Further analyses after exclusion of those LE patients without any melanocytes showed that the remaining patients also presented significantly smaller melanocyte counts for HMB-45 (10.4 ± 3.5 vs. 29.5 ± 17.4 , $p = 0.004$) and Melan A (17.0 ± 9.2 vs. 60.1 ± 24.9 , $p = 0.007$) in comparison to controls.

There were five patients whose biopsies showed melanocytes, three of which were diagnosed as SCLE and two as CCLE. Overall, biopsies showing at least one melanocyte were found in 60% of SCLE patients, but only in 28.6% of CCLE patients ($p > 0.05$).

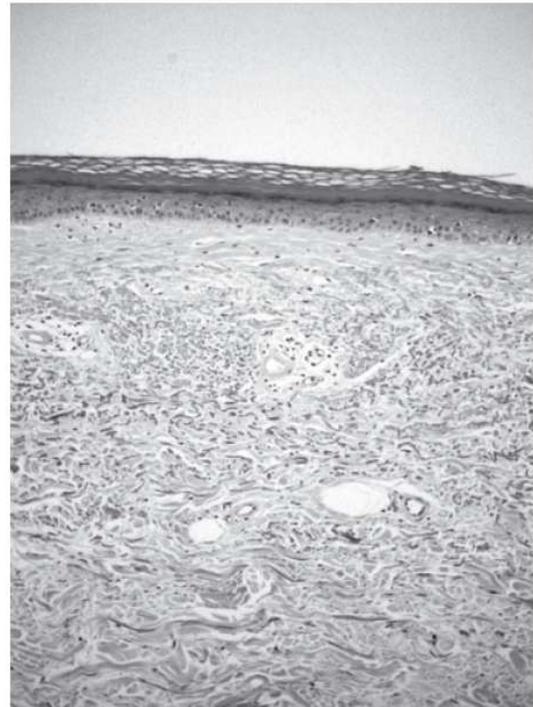


Fig. 2. Hematoxylin-eosin staining of depigmented lesions (DL, $\times 200$). Mild hyperkeratosis; thinning and flattening of epidermis; dermal fibrosis and elastosis.

Discussion

DL occur in a wide variety of dermatoses, as a transitory (e.g. psoriasis, allergic contact dermatitis, atopic dermatitis) or a definitive feature (e.g. lichen sclerosus, vitiligo). DL are poorly studied in skin diseases other than vitiligo.⁶⁻⁸ Although histological findings in LE are extensively described, we were not able to find any study specifically devoted

Table 3. Melanization, dermal melanophages and melanocytes numbers (per 8 fields of $400\times$) in depigmented lesions

| Case | Diagnosis | Melanization | Dermal melanophages | Melanocytes by HMB-45 | Melanocytes by Melan A |
|------|-----------|--------------|---------------------|-----------------------|------------------------|
| 1 | CCLE | Absent | Absent | Absent | Absent |
| 2 | CCLE | Absent | Absent | Absent | Absent |
| 3 | CCLE | Absent | Absent | Absent | Absent |
| 4 | CCLE | Absent | Absent | Absent | Absent |
| 5 | SCLE | Present | Absent | 7 | 10 |
| 6 | CCLE | Present | Absent | 7 | 12 |
| 7 | SCLE | Absent | Present | Absent | Absent |
| 8 | SCLE | Present | Present | 13 | 31 |
| 9 | CCLE | Absent | Absent | Absent | Absent |
| 10 | SCLE | Present | Present | 15 | 22 |
| 11 | CCLE | Present | Present | 10 | 10 |
| 12 | SCLE | Absent | Absent | Absent | Absent |

CCLE, chronic cutaneous lupus; SCLE, Subacute lupus.

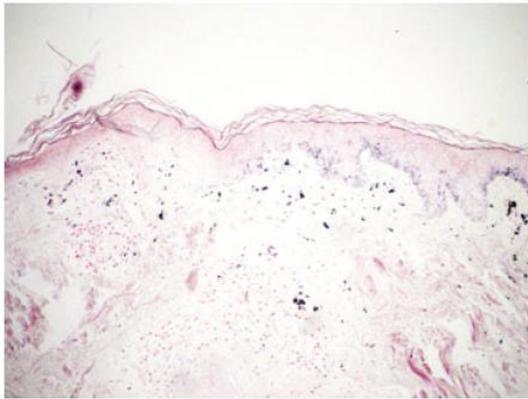


Fig. 3. Fontana-Masson staining of depigmented lesions (DL, $\times 200$). Melanization of basement membrane and pigmentary incontinence.

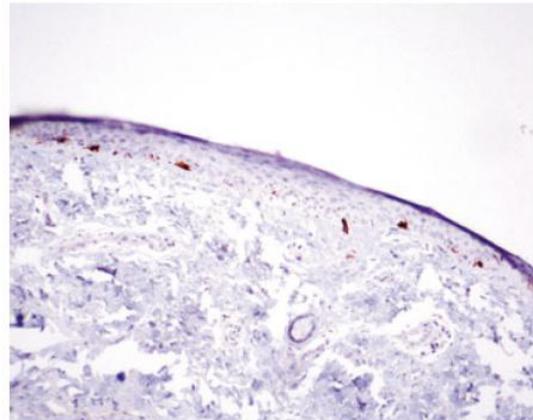


Fig. 4. Melan A immunohistochemical staining of depigmented lesions (DL, $\times 200$). Number of melanocytes is markedly reduced.

to DL in this condition. This is possibly as a result of the low frequency of such lesions in LE. On clinical grounds, classic lesions of CCLE can evolve to noninflamed areas of hypopigmentation. In SCLE, hypopigmentation appears centrally in annular lesions or as a long-lasting leukoderma when typical lesions have resolved.⁹ When DL occur with no scaling, atrophy or follicular plugging on clinical inspection, diagnosis may be challenging. Fortunately, such lesions in the absence of typical clinical context seem to be uncommon.

The thickening of basement membrane, the presence of inflammatory infiltrates, the hyperkeratosis and the rete ridges loss/atrophy of epidermis were the most common histological findings in our cases. Except for the thickening of basement membrane, the other features are not diagnostic of LE. Despite this, in four out of the 12 patients, biopsies of DL fulfilled histological criteria for definitive LE diagnosis¹⁰

Basophilic degeneration of the collagen is common in LE lesions.¹¹ In addition to sun exposure, the absence of melanocytes may have contributed for elastosis in our patients. On the opposite, the location of dermal fibrosis close to the epidermis and above the elastotic material indicates that a regenerative process has taken place in the dermis and that DL are in part secondary to scarring.

The histological features found in our patients might be useful when clinical diagnosis is doubtful, especially when vitiligo is considered. The most prominent feature in vitiligo is the absence of melanin and melanocytes with mild findings in epidermis and dermis. Lymphocytic infiltrates are described in vitiligo, especially in lesions showing erythema, scaling and marginal hyperpigmentation,

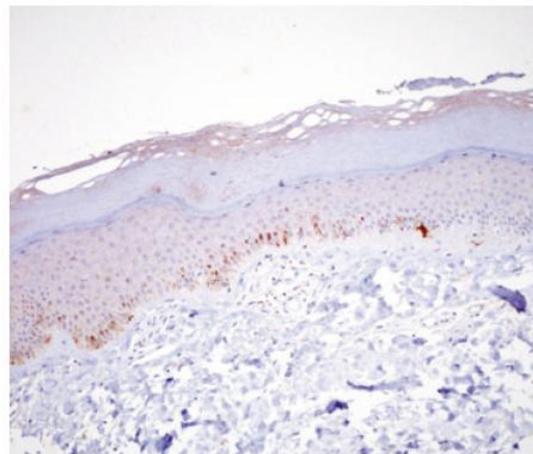


Fig. 5. HMB-45 immunohistochemical labeling of depigmented lesions (DL, $\times 200$)

but degenerative changes like epidermal atrophy, dermal fibrosis or the lack of appendages are uncommon.^{12,13}

Monoclonal antibodies HMB-45 and anti-Melan A are specific immunohistochemical markers for melanocytic lineage cells. HMB-45 antibody reacts against a cytoplasmic antigen, the premelanosome glycoprotein gp100. The expression of gp100 indicates the presence of stage I and stage II melanosomes and active melanogenesis. HMB-45 reacts against cells of most melanomas, some nevi cells, normal fetal melanocytes but not normal resting adult melanocytes. Stimulated adult melanocytes, however, are positive for HMB-45.¹⁴ Melan A is a small cytoplasmic protein of 22kd that is believed to be a melanosomal component.

França & de Souza

It is expressed in skin, melanocytic nevi and melanomas¹⁵

Overall, DL in any dermatosis occur as a result of three potential mechanisms: destruction of melanocytes; decrease in melanin production or defective melanin transfer of keratinocytes from melanocytes. In most of our patients, melanocytes were absent by Fontana-Masson, Melan A and HMB-45. When melanocytes were found, their counts were significantly smaller than in normal skin. Labeling by HMB-45 confirmed that these melanocytes were functionally active. In our study, the presence of melanin granules in basal keratinocytes also suggests that the relationship between melanocytes and keratinocytes is preserved. Therefore, we hypothesize that hypopigmentation in cutaneous LE is mainly caused by the loss of melanocytes rather than disruption in melanogenesis or block in melanin transfer. Despite this, the presence of active melanocytes found in some biopsies suggests that repigmentation of DL might be possible in LE. In our biopsies, the melanocyte count was higher in patients with SCLE than CCLE, suggesting that repigmentation may be more likely in the former subtype. We believe that cellular infiltration, which is more prominent and frequently lichenoid in CCLE, may be responsible for more severe melanocytes loss in this subtype.

References

1. Sontheimer RD. The Lexicon of cutaneous lupus erythematosus—a review and personal perspective on the nomenclature and classification of the cutaneous manifestations of lupus erythematosus. *Lupus* 1997; 6: 84.
2. Albrecht J, Berlin JA, Braverman IM, et al. Dermatology position paper on the revision of the 1982 ACR criteria for systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2004; 13: 839.
3. Khaitan BK, Sood A, Mittal R, Singh YL, Singh MK. Chilblain lupus erythematosus mimicking acrofacial vitiligo. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 2003; 69: 340.
4. Forestier JY, Ortonne JP, Thivolet J, Souteyrand P. Lupus érythémateux et vitiligo. *Ann Dermatol Venereol* 1981; 108: 33.
5. Gul U, kilic A, Tulunay O, Kaygusuz G. Vitiligo associated with malignant melanoma and lupus erythematosus. *J Dermatol* 2007; 34: 142.
6. Carlson JA, Graboswski R, Mu XC, et al. Possible mechanisms of hypopigmentation in lichen sclerosis. *Am J Dermatopathol* 2002; 24: 97.
7. Whitmore SE, Simmons-O'Brien E, Rotter FS. Hypopigmented mycosis fungoides. *Arch Dermatol* 1994; 130: 476.
8. Clayton R, Breathnach A, Martin B, et al. Hypopigmented sarcoidosis in the negro: report of eight cases with ultrastructural observations. *Br J Dermatol* 1977; 96: 119.
9. Sontheimer RD. Lupus Erythematosus. In Freedberg IM, Eisen AZ, Fitzpatrick TB, et al. Fitzpatrick's dermatology in general medicine: McGraw-Hill, 1999; 1993.
10. Winfield H, Jaworsky C. Connective tissue diseases. In Elder DE. Histopathology of the skin. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2009; 279.
11. David-Bajar KM, Davis BM. Pathology, immunopathology and immunohistochemistry in cutaneous lupus erythematosus. *Lupus* 1997; 6: 145.
12. Attili VR, Attili SK. Lichenoid inflammation in vitiligo—a clinical and histopathologic review of 210 cases. *Int J Dermatol* 2008; 47: 663.
13. Montes LF, Abulafia J, Wilborn WH, Hyde BM, Montes CM. Value of histopathology in vitiligo. *Int J Dermatol* 2003; 42: 57.
14. Schaumburg-Lever G, Metzler G, Kaiserling E. Ultrastructural localization of HMB-45 binding sites. *J Cutan Pathol* 1991; 18: 432.
15. Kawakami Y, Battles JK, Kobayashi T, et al. Production of recombinant MART-1 proteins and specific antiMART-1 polyclonal and monoclonal antibodies: use in the characterization of the human melanoma antigen MART-1. *J Immunol Methods* 1997; 202: 13.