



PERFIL IMUNOFENOTÍPICO DO INFILTRADO MACROFÁGICO NO XANTOGRANULOMA JUVENIL

Aluna bolsista: Laura Moya Kazmarek (RA: 178178)

Orientadora: Maria Letícia Cintra

Pesquisadora associada: Andressa Christine Ferreira Silva

Outros membros da equipe: Dra Lissa Sabino de Matos; Dra. Bruna Morassi Sasso; Marina Gagheggi Maciel.

Campinas, agosto de 2020

Universidade de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas, Departamento de Anatomia Patológica

Introdução: As histiocitoses representam um grupo de desordens em que há proliferação de monócitos e macrófagos de variadas linhagens. São habitualmente classificadas em Langerhans e não Langerhans. Embora raro, o xantogranuloma juvenil (XGJ) é a forma mais comum de histiocitose não-Langerhans. Presume-se que o tumor se desenvolva após estímulos desconhecidos (infecciosos ou físicos), que provocam uma reação histiocitária granulomatosa. O XGJ é caracterizado, histologicamente, por um infiltrado dérmico denso, bem demarcado, mas não encapsulado, composto de histiócitos mononucleados, células gigantes, células de Touton, linfócitos, eosinófilos, neutrófilos e mastócitos, em diferentes proporções. Clinicamente o XGJ é caracterizado por uma pápula ou nódulo bem delimitado, de consistência firme, variando entre 0,5 a 2 cm de diâmetro. Nos estágios iniciais tem cor rosa ou avermelhada com nuance amarelada, mas com o tempo adquire tom amarelo-amarronzado e pode desenvolver ocasionalmente telangiectasias na superfície. O começo é abrupto, mas novas lesões podem continuar a aparecer por anos. O XGJ geralmente é assintomático. A incidência do XGJ é desconhecida, mas pode ser maior do que é geralmente descrita porque os XGJs ocorrem no início da vida, muitas vezes como lesões solitárias, regredem dentro de alguns anos, e são muitas vezes confundidos com nevos melanocíticos. Os XGJs têm sido associados à leucemia mielomonocítica crônica juvenil (LMJ). A LMJ também é observada em pacientes com neurofibromatose (a incidência é entre 1: 2000 e 1: 5000). Raramente, são visto pacientes com XGJ e neurofibromatose. e, nestes casos, há um aumento de 20 a 32 vezes do risco de LMJ, quando comparado a pacientes com neurofibromatose isolada. Outras doenças associadas ao XGJ incluem: urticária pigmentosa, diabetes mellitus insulino-dependente, prurido aquagênico e até infecção por citomegalovírus (CMV). Os achados imunoistoquímicos são importantes, pois o perfil de marcadores distintos pode ajudar a estabelecer um diagnóstico em variantes atípicas de XGJ, e separar o XGJ de outras histiocitoses de células de Langerhans, não-Langerhans e lesões fibrocíticas. Diversos trabalhos estudaram os marcadores imunoistoquímicos no XGJ, na tentativa de definir a citogênese do tumor. Originalmente considerado um tumor da linhagem de células endoteliais, algumas outras hipóteses sobre a gênese do XGJ incluíram macrófagos, dendrócitos dérmicos, células dérmicas indeterminadas e, mais recentemente, monócitos CD4+. Apesar de vários estudos anteriores terem avaliado o imunofenótipo do XGJ, eles se concentraram em um número limitado de marcadores de macrófagos. Entre os marcadores mais estudados no XGJ estão o Fator XIIIa que apresenta alta positividade nos trabalhos realizados, bem como o marcador S-100, que exclui este diagnóstico, por apresentar baixa positividade. Outro marcador bem documentado é a lysozima, que ao contrário dos descritos acima, apresenta imunomarcagem variada, oscilando entre 100 e 23%. Outros marcadores menos estudados, mas já relatados são o CD4, CD11c, CD163, CD31 e CD45. Dentre estes, apenas o CD163 se repetiu no nosso trabalho.

Justificativa:

Embora raro, o XGJ é o tipo mais comum de histiocitose não Langerhans, podendo apresentar-se clinicamente de formas variadas, sendo seu diagnóstico anatomopatológico essencial. Apesar de benigno, nos pacientes acometidos de forma sistêmica, podem se associar a graves comorbidades. Este fato ressalta a necessidade de um diagnóstico preciso. A avaliação de novos marcadores imunistoquímicos permite ampliar o conhecimento da citogênese e refinar o diagnóstico diferencial. Conhecer melhor a citogênese do tumor, auxilia no desenvolvimento de abordagem terapêutica específica.

Objetivo:

Estudar, em lesões cutâneas de 25 pacientes com XGJ, os achados clínicos, histológicos e o perfil imunofenotípico do infiltrado macrofágico de tipo M2, correlacionando os resultados entre si.

Métodos:

A análise dos subtipos macrofágicos se deu pelo método imunistoquímico, que consiste na utilização de anticorpos para a identificação de proteínas e outras moléculas em uma célula-alvo, no caso os macrófagos e seus subtipos - a partir de um mecanismo "anticorpo-antígeno". Os anticorpos empregados foram: o CD68, CD204, CD163, MAC387 e o HAM56. Os resultados foram planilhados em Excel® e analisados estatisticamente por meio do software SAS 9.0 ®. O teste exato de Fisher ou qui-quadrado foi utilizado para avaliar a associação entre variáveis qualitativas. Mann-Whitney e Kruskal-Wallis- ANOVA ranqueado, seguido de pós-teste de Tukey, foram utilizados para testar diferenças entre as médias de variáveis quantitativas. O teste de correlação de Spearman foi empregado para avaliar a associação entre as variáveis quantitativas. P-valores menores que 0,05 foram considerados significantes.

Resultados:

Houve predomínio de pacientes do sexo masculino e média de idade de 23 anos. As lesões, na maioria, se desenvolveram na região axial e a média de área era de 6,7 mm². À histologia, a maioria foi removida em fase de maturidade. A densidade das células imunomarcadas era similar, com relação significativa entre elas, e franca aposição à epiderme, exceto em duas, em regressão. A densidade das células MAC387+ era significativamente menor que a das demais, sem aposição à epiderme e, junto com a das HAM 56+, se relacionava às lesões mais jovens; a densidade dos macrófagos CD163+ e CD204+, se relacionava às lesões maiores.

Discussão e conclusão:

As histiocitoses são um grupo de doenças identificadas e classificadas pelo tipo celular. As histiocitoses de células de Langerhans são compostas por células CD1a+, Langerina+ e S100+. Já as histiocitoses de células não Langerhans, são distúrbios caracterizados por diferentes tipos de macrófagos e outras células, que não preenchem os critérios descritos para as histiocitoses de células de Langerhans. As células do sistema fagocítico mononuclear, incluindo as células de Langerhans, podem evoluir de uma série de precursores, como monócitos, linfócitos e possivelmente até células mesenquimatosas. Atualmente, acredita-se que a maioria dos histiócitos surja de uma célula-tronco CD34+, que, estimulada por citocinas, como GM-CSF e TNF alfa, dá origem a duas linhagens de células, CD14+ e CD14-. A célula CD14-, na presença de TNF alfa e GM-CSF, desenvolve-se na célula de Langerhans, enquanto a célula CD14+ se desenvolve em dendrócito intersticial/dérmico ou no monócito/macrófago, dependendo da citocina que as estimula.

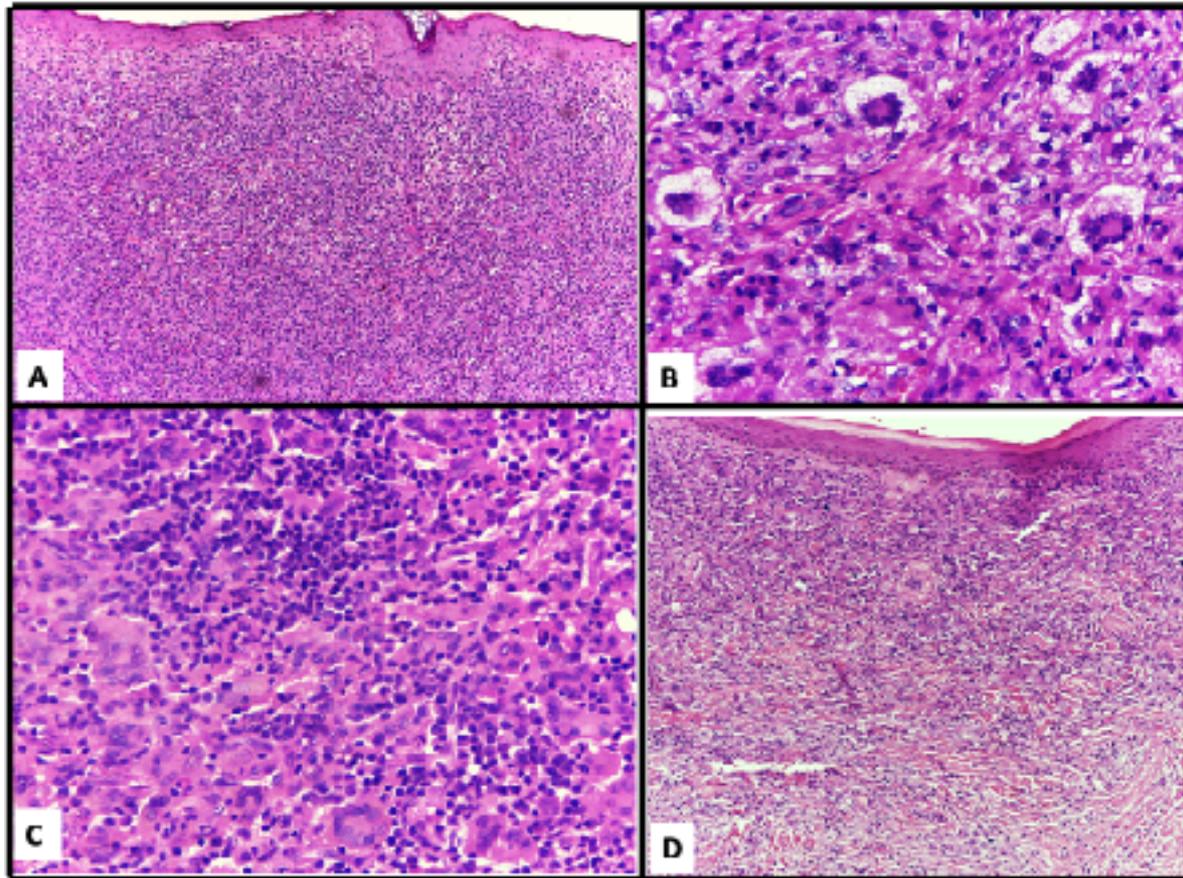
O dendrócito intersticial/dérmico tem, como principal característica, expressar o Fator XIIIa e parece ser a principal célula precursora das histiocitoses não Langerhans. As histiocitoses de células não Langerhans, são geralmente desordens proliferativas benignas que podem ser divididas em três grupos maiores. As que afetam predominantemente a pele, são o xantogranuloma juvenil, a histiocitose cefálica benigna, o histiocitoma eruptivo generalizado, o xantogranuloma do adulto e a histiocitose nodular progressiva. Aquelas que afetam a pele, mas têm um componente sistêmico mais importante, incluem o xantoma disseminado, e a retículo-histiocitose multicêntrica. Finalmente, as desordens em que o componente sistêmico é preponderante, são representadas pela doença de Erdheim-Chester e doença de Rosai-Dorfman.

São várias as doenças incluídas no grupo das histiocitoses de células de Langerhans, de acordo com as suas características e apresentações clínicas. Entretanto, estudos recentes apontam que a maioria das histiocitoses de células não Langerhans apresenta uma mesma célula precursora, com o mesmo imunofenótipo, que expressa o Fator XIIIa, particularmente no início, e que também se marca pelo anti- CD68, CD163, fascin e CD14, mas não pelo S100 e CD1a, estes últimos adquiridos posteriormente.

À histologia, para o diagnóstico do xantogranuloma juvenil, as características já bem estabelecidas são: 1- na derme, infiltrado de numerosos histiócitos, junto com linfócitos, plasmócitos e eosinófilos; 2- células espumosas/xantomatosas, células gigantes de corpo estranho e células de Touton podem ser vistas em estágios mais maduros; 3- nos estágios finais da lesão, os fibroblastos aumentam em número, produzem colágeno, e substituem progressivamente as demais células. Todos os casos selecionados no trabalho contemplavam todas as premissas histopatológicas para o diagnóstico de xantogranuloma juvenil, encontrando-se, a maioria das lesões, em fase de maturidade. As classificadas como recentes apresentavam macrófagos pequenos, com poucas células

de Touton ou inflamatórias de outros tipos; já as lesões mais maduras exibiam maior número de células espumosas, de Touton e, em proporção variável, linfócitos, plasmócitos e eosinófilos. As lesões mais antigas apresentavam número variado de células fusiformes e fibrose (Fig. 1).

Figura 1- Xantogranuloma juvenil: fases de desenvolvimento



A=fase inicial; B e C=fase de maturidade; D=fase tardia. H&E, aumento original x4 (A), x40 (B e C) e x 100 (D).

Os marcadores imunoistoquímicos estudados neste trabalho foram selecionados para melhor entender a imuno-histogênese do XGJ, bem como identificar os diferentes marcadores imunoistoquímicos para o tumor

O anti-CD68 é classicamente empregado para demonstrar qualquer tipo de macrófago (marcador pan-macrofágico), e como esperado, apresentou, na análise qualitativa, marcação forte e intensa para células de Touton e macrófagos pequenos. Desta forma, observamos que todas as amostras, independentemente do tempo em que foram coletadas, mantinham intactos os epítomos para a reação. Além disso, todas as lesões que estudamos continham, em diferentes proporções, macrófagos imunomarcados pelos diferentes anticorpos estudados. Muitas delas, mostravam íntima aposição à epiderme.

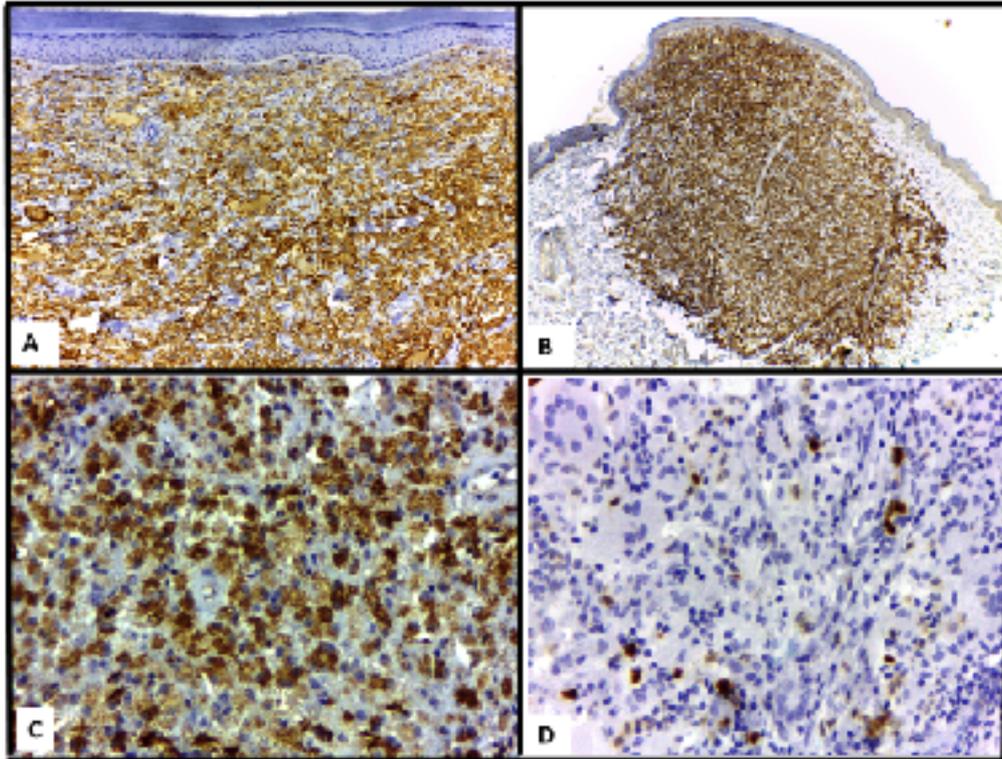
Com relação ao anticorpo anti-CD163, sabe-se que ele reconhece uma proteína de membrana do tipo I, presente preferencialmente em macrófagos de tecidos do subtipo M2. O antígeno CD163 é uma glicoproteína de 130 kd que recentemente foi caracterizada como um receptor eliminador de hemoglobina, retirando os complexos haptoglobina-hemoglobina da circulação. Estudos imunoistoquímicos anteriores, usando amostras de tecidos congelados, mostraram que o CD163 apresenta alta especificidade para monócitos e macrófagos. De fato, este foi o anticorpo que corou o maior número de células, de forma mais intensa, consistente com um predomínio de macrófagos M2 no XGJ, indicando que a resposta macrofágica na lesão estaria mais ligada ao reparo tecidual do que à lise de algum agente/patógeno local.

O HAM56, assim como o CD68, é um marcador que apresenta especificidade para os macrófagos dos tecidos. Os resultados obtidos no nosso trabalho não diferiram dos da literatura, encontrando-se imunomarcação difusa nos macrófagos dérmicos, especialmente nas células que apresentavam estreita aposição à epiderme.

O MAC387 identifica macrófagos derivados de monócitos. Reage contra o antígeno L1 que está presente nas células mielomonocíticas, bem como na epiderme e no epitélio escamoso das mucosas, folículos pilosos e glândula sebácea. Na nossa amostra, o MAC 387 apresentou imunomarcação citoplasmática em pequeno número de células macrofágicas pequenas. Estas não exibiam aposição à epiderme, nos fazendo

acreditar que, como o maior número de lesões da nossa casuística encontrava-se em fase de maturidade, possivelmente, com o tempo, os macrófagos perdem o antígeno L1 (Fig. 2).

Figura 2- Xantogranuloma juvenil: imunomarcadores



A-CD163; B-CD204; C-Ham56; D-Mac387. Aumento original x 400.

Presume-se que os XGJs se desenvolvem após estímulos desconhecidos (infecciosos ou físicos), que provocam uma reação histiocítica granulomatosa. Sabe-se que os processos granulomatosos associam-se a respostas imunológicas crônicas, mediadas por células histologicamente caracterizadas por macrófagos, células epitelioides e células gigantes multinucleadas. Muitas vezes são deflagradas por um agente infeccioso, mas não infreqüentemente, nenhum estímulo antigênico pode ser identificado. A pele pode ser um alvo para o desenvolvimento destes processos, especialmente nas áreas que foram previamente danificadas por algum tipo de agente (infecções herpéticas, trauma, queimaduras térmicas ou solares, vacinações, tatuagens, etc). Estas áreas se enquadram no novo conceito de “distrito cutâneo imunocomprometido” (DCI), em que há desregulação imunológica adquirida local. Esta poderia pavimentar o caminho para o início de doenças oportunistas, como infecções, tumores e processos granulomatosos como seria o caso do xantogranuloma juvenil. A íntima aposição das células imunomarcadas à epiderme, nos leva a especular que um estímulo antigênico que modificasse determinada região da pele, estimularia a epiderme que, se sabe, é um tecido imunológico e não apenas de barreira, a produzir quimiocinas e fatores de crescimento, deflagrando o desenvolvimento do XGJ. Muitos dos macrófagos mostravam íntima aposição à epiderme, sugerindo participação desta na patogênese do processo.

Os resultados do trabalho podem auxiliar a compreender melhor a patogênese e, adicionalmente, auxiliar a definir o diagnóstico em variantes atípicas de XGJ.

Referências:

1. Cohen BA, Hood A. Xanthogranuloma: report on clinical and histological findings in 64 patients. *Pediatr Dermatol* 1989;6:262-6
2. Malbos S, Guilhou J J, Meynadier J, et al. Xanthogranuloma in adults: clinicopathological study of a case. *Dermatologica* 1979;158:334-42.
3. Murphy JT, Soeken T, Megison S, Perez E. Juvenile xanthogranuloma: diverse presentations of noncutaneous disease. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* 2014;36(8):641-5.
4. Freyer DR, Kennedy R, Bostrom BC, Kohut G, Dehner LP. Juvenile xanthogranuloma: forms of systemic disease and their clinical implications. *J. Pediatr.* 1996;129(2):227-37.
5. Haroche J, Ablu O. Uncommon histiocytic disorders: Rosai-Dorfman, juvenile xanthogranuloma, and Erdheim-Chester disease. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2015;2015:571-8.
6. Mc Donagh JER. A contribution to our knowledge of naevoxanthoendothelioma. *Br J Dermatol* 1912;24:85-9.

7. Cline MJ. Histiocytes and histiocytosis. *Blood* 1994;84:2840-53.
8. Misery L, Boucheron S, Claudy AL. Factor XIIIa expression in juvenile xanthogranuloma. *Acta Derm Venereol* 1994;74:43-4.
9. Kraus MD, Haley JC, Ruiz R, Essary L, Moran CA, Fletcher CD. "Juvenile" xanthogranuloma: an immunophenotypic study with a reappraisal of histogenesis. *Am J Dermatopathol* 2001;23:104-11.
10. Zelger B, Cerio R, Orchard G, Wilson-Jones E. Juvenile and adult xanthogranuloma. A histological and immunohistochemical comparison. *Am J Surg Pathol* 1994;18:126-35.
11. Weitzman S, Jaffe R. Uncommon histiocytic disorders: the non-Langerhans cell histiocytoses. *Pediatr Blood Cancer*. 2005;45(3):256-264.
12. Caux C, Lebecque S, Liu J-Y, et al. Developmental Pathways of human myeloid dendritic cells. In: Lotze MT, Thomson AW, Editors. *Dendritic Cells: biology and clinical application*. San Diego: Academic Press; 1999. Pp 63-92.
13. Collie JS, Harper CD, Fillman EP. Juvenile Xanthogranuloma (Nevoxanthoendothelioma, JXG) [Updated 2020 Jul 2]. In: *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020
14. Kigerl KA, Gensel JC, Ankeny DP, Alexander JK, Donnelly DJ, Popovich PG. Identification of two distinct macrophage subsets with divergent effects causing either neurotoxicity or regeneration in the injured mouse spinal cord. *J Neurosci* 2009; 29:13435-13444.
15. Sandell RF, Carter JM, Folpe AL. Solitary (juvenile) xanthogranuloma: a comprehensive immunohistochemical study emphasizing recently developed markers of histiocytic lineage. *Hum Pathol* 2015;46:1390-7.
16. Sangüeza OP, Salmon JK, White CR Jr, Beckstead JH. Juvenile xanthogranuloma: a clinical, histopathologic and immunohistochemical study. *J Cutan Pathol*. 1995;22(4):327-35.