



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS.

GEISILENE RUSSANO DE PAIVA SILVA

PESQUISA DA EXPRESSÃO DA MOLÉCULA CD30/Ki1 EM MASTOCITOSE
CUTÂNEA E SISTÊMICA.

*CD30/Ki1 MOLECULE EXPRESSION RESEARCH IN
CUTANEOUS AND SYSTEMIC MASTOCYTOSIS.*

CAMPINAS

2018

GEISILENE RUSSANO DE PAIVA SILVA

PESQUISA DA EXPRESSÃO DA MOLÉCULA CD30/Ki1 EM MASTOCITOSE
CUTÂNEA E SISTÊMICA.

*CD30/Ki1 MOLECULE EXPRESSION RESEARCH IN
CUTANEOUS AND SYSTEMIC MASTOCYTOSIS.*

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutora em Ciências, na Área de Clínica Médica.

Thesis presented to Post Graduation Program Faculty of Medical Sciences from State University of Campinas as part of the requirements for obtaining PhD degree in Sciences in Clinical Medicine.

ORIENTADOR: PROF. DR. JOSÉ VASSALLO
COORIENTADOR: PROF. DR. LUIS OTÁVIO ZANATTA SARIAN

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA
ALUNA GEISILENE RUSSANO DE PAIVA SILVA ORIENTADA PELO
PROF. DR. JOSÉ VASSALLO

CAMPINAS

2018

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): Não se aplica.

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

Si38p Silva, Geisilene Russano de Paiva, 1977-
Pesquisa da expressão da molécula CD30/Ki1 em mastocitose cutânea e sistêmica / Geisilene Russano de Paiva Silva. – Campinas, SP : [s.n.], 2018.

Orientador: José Vassallo.
Coorientador: Luis Otávio Zanatta Sarian.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Mastocitose. 2. Antígenos CD30. 3. Imuno-histoquímica. I. Vassallo, José, 1957-. II. Sarian, Luís Otávio Zanatta, 1974-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: CD30/Ki1 molecule expression research in cutaneous and systemic mastocytosis

Palavras-chave em inglês:

Mastocytosis

Antigens, CD30

Immunohistochemistry

Área de concentração: Clínica Médica

Titulação: Doutora em Ciências

Banca examinadora:

José Vassallo [Orientador]

Kátia Borgia Barbosa Pagnano

Márcia Torresan Delamain

Fernando Augusto Soares

Antônio Hugo José Fróes de Marques Campos

Data de defesa: 20-12-2018

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

GEISILENE RUSSANO DE PAIVA SILVA

ORIENTADOR: PROF. DR. JOSÉ VASSALLO

COORIENTADOR: PROF. DR. LUIS OTAVIO ZANATTA SARIAN

MEMBROS:

1. PROF. DR. JOSÉ VASSALLO

2. PROF. DR. FERNANDO AUGUSTO SOARES

3. PROF. DR. ANTÔNIO HUGO JOSÉ FRÓES DE MARQUES CAMPOS

4. PROFA. DRA. KÁTIA BORGIA BARBOSA PAGNANO

5. PROFA. DRA. MÁRCIA TORRESAN DELAMAIN

Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros da banca examinadora encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

DATA DA DEFESA: 20/12/2018

DEDICATÓRIA

À DEUS pela força espiritual de todos os dias...

*Ao meu amado “cheri” Nivaldo Adolfo por todo seu amor e cumplicidade!”je
t’aime mon amour”*

*Aos meus pais queridos Marlene e Maurício, minha irmã e cunhado pelo apoio
incondicional em todos os momentos;*

À “mon petit” Leandro que sempre me encanta.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. José Vassallo pela amizade e revisão cuidadosa desta tese.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Luis Otávio Zanatta Sarian pelo incentivo e revisão do artigo.

Ao Prof. Dr. Pierre Brousset pela amizade, cumplicidade e revisão do artigo.

À Profa. Dra. Camille Laurent pela amizade, cumplicidade e revisão do artigo.

À Profa. Dra. Sophie Derchain pela amizade e cumplicidade.

Aos funcionários da ASTEC pela disponibilidade e solicitude.

RESUMO

A mastocitose é uma doença rara caracterizada por proliferação clonal anormal de mastócitos com um espectro amplo de manifestações clínicas, variando desde formas cutâneas (Mastocitose Cutânea - MC) que podem ter regressão espontânea até formas agressivas com acometimento sistêmico (Mastocitose Sistêmica - MS) e prognóstico pejorativo, como a Leucemia de Células Mastocitárias. O diagnóstico é baseado em critérios maior e menores bem definidos pela Organização Mundial da Saúde (OMS), sendo o critério maior a demonstração de agregados multifocais de mastócitos com características neoplásicas infiltrando a medula óssea e/ou outros órgãos extracutâneos. O critério maior pode ser associado aos critérios menores, sendo que alguns desses critérios menores podem utilizar marcadores imuno-histoquímicos, tais como o CD2 e CD25. Outros imunomarcadores que auxiliam no diagnóstico são a triptase e o receptor c-Kit/CD117. A molécula CD30 é expressa em uma pequena população de células T e B ativadas, e com alta expressão em neoplasias malignas hematológicas como linfomas de Hodgkin e Linfoma T Anaplásico de Grandes Células, dentre outras neoplasias de células T e B. Menos comumente também pode ser expressa em neoplasias não hematológicas como tumores de células germinativas e o carcinoma embrionário testicular. O CD30 é membro da superfamília dos receptores de fator de necrose tumoral (TNFR). A sinalização através destes receptores afeta a proliferação celular, sobrevivência e diferenciação e estes efeitos são mediados através de domínios citoplasmáticos destes receptores. A presença do CD30 na mastocitose é considerada aberrante e vem sendo descrita em relatos os quais demonstram uma associação quase exclusiva deste imunomarcador às formas agressivas de mastocitose. A positividade do CD30 nas formas indolentes de MS, inclusive na forma cutânea de mastocitose, é considerada excepcional. Com o objetivo de avaliar a prevalência do CD30 em mastócitos neoplásicos, nós realizamos um estudo retrospectivo de casos de MC e MS no Laboratório de Anatomia Patológica do Instituto Universitário do Câncer Toulouse – Oncopole, Toulouse – França no período entre 2000 e 2006. Além da análise histopatológica dos casos destas duas formas clínicas, foram também realizadas imuno-histoquímicas para os seguintes marcadores: CD30, CD2, CD25, c-Kit/CD117, além de outros imunomarcadores. De um total de 42 casos de mastocitose, encontramos 29 casos de MC (n = 29) e 13 casos de MS (n = 13). O CD30 foi positivo em um total de 39 casos ($39/42 = 92,8\%$). Nos casos de MC, 28 de um total de 29 casos foram CD30 positivos. Na MS 11 de um total de 13 casos foram CD30 positivos. Os casos controles onde os mastócitos evidenciados nas peles normais e os mastócitos ativados encontrados nas peles com urticária, a imunomarcação CD30 foi negativa. Os achados deste

estudo sugerem que o CD30 pode ser considerado um marcador neoplásico de mastocitose, independente da sua apresentação clínica (Cutânea ou Sistêmica), mas não é associado exclusivamente em formas agressivas de mastocitose, como previamente descrito na literatura.

Palavras-chave: Mastocitose - CD30 – imuno-histoquímica.

ABSTRACT

Mastocytosis is a rare disease characterized by abnormal clonal proliferation of mast cells with a broad spectrum of clinical manifestations, ranging from cutaneous forms (Cutaneous Mastocytosis - CM) that can spontaneously regress to aggressive forms with systemic multiorgan involvement (Systemic Mastocytosis - SM) and pejorative prognosis, such as Mast Cell Leukemia. The diagnosis is based on major and minor criteria that are well defined by the World Health Organization (WHO). The major criterion is the demonstration of multifocal aggregates of mast cells with neoplastic features infiltrating bone marrow and/or other extracutaneous organs. The major criterion may be associated with minor criteria, and some of these minor criteria consist of immunohistochemical markers such as CD2 and CD25. Other useful immunomarkers in the diagnosis are tryptase and c-Kit/CD117 receptor. The CD30 molecule is expressed in a small population of activated T and B cells, and is highly expressed in hematological malignancies such as Hodgkin's lymphomas and Large Cell Anaplastic T-Lymphomas, among other T-cell and B-cell neoplasms. It may be expressed in non-hematological neoplasms such as germ cell tumors and testicular embryonal carcinoma. CD30 is a member of the tumor necrosis factor receptor (TNFR) superfamily. Signaling through these receptors affects cell proliferation, survival and differentiation and these effects are mediated through cytoplasmic domains of these receptors. The presence of CD30 in mastocytosis is considered to be aberrant and has been described in some reports which demonstrate a nearly exclusive association of this immunomarker to aggressive forms of mastocytosis. The positivity of CD30 in the indolent forms of SM, including the cutaneous form, is considered exceptional. In order to evaluate the prevalence of CD30 in neoplastic mast cells, we performed a retrospective study of CM and SM cases in the Laboratory of Pathological Anatomy of the Toulouse University Cancer Institute - Oncopole, Toulouse - France between 2000 and 2006. Besides the histopathological analysis of these two clinical forms, it was also performed immunohistochemistry for the following markers: CD30, CD2, CD25, c-Kit/CD117, as well as other immunomarkers. From a total of 42 cases of mastocytosis, we found 29 cases of CM (n = 29) and 13 cases of SM (n = 13). CD30 was positive in a total of 39 cases ($39/42 = 92.8\%$). In cases of CM, 28 out of 29 cases were CD30 positive. In SM, 11 out of 13 cases were CD30 positive. The control cases which consisted of mast cells from normal skin samples and activated mast cells found in urticaria were CD30 negative. The findings of this study suggest that CD30 may be considered a neoplastic marker of mastocytosis, regardless of its clinical presentation (Cutaneous or Systemic), and it is not

nearly exclusively associated to aggressive forms of mastocytosis, as previously described in the literature.

Keywords: Mastocytosis - CD30 – immunohistochemistry.

RÉSUMÉ

La mastocytose est une maladie rare caractérisée par une prolifération clonale anormale de mastocytes présentant un large spectre de manifestations cliniques, allant des formes cutanées (Mastocytose Cutanée - MC) qui peuvent régresser spontanément aux formes agressives avec atteinte systémique (Mastocytose Systémique - MS) comme la Leucémie à Cellules Mastocytaires. Le diagnostic repose sur des critères majeur et mineurs bien définis par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), étant le critère majeur caractérisé par la démonstration d'agrégats multifocaux de mastocytes présentant des caractéristiques néoplasiques infiltrant la moelle osseuse et/ou d'autres organes extracutanés. Le critère majeur peut être associé à des critères mineurs, et certains de ces critères mineurs peuvent utiliser des marqueurs immunohistochimiques tels que CD2 et CD25. La tryptase et le récepteur c-Kit/ CD117 sont d'autres immunomarqueurs utiles au diagnostic. La molécule CD30 est exprimée dans une petite population de cellules T et B activées et est fortement exprimée dans les hémopathies malignes telles que les Lymphomes de Hodgkin et les Lymphomas T Anaplasiques à Grandes Cellules, entre autres néoplasies à cellules T et B. Il peut être aussi exprimé dans des néoplasies non hématologiques tels que les tumeurs des cellules germinales et le carcinome embryonnaire testiculaire. Le CD30 est un membre de la superfamille des récepteurs du facteur de nécrose tumorale (TNFR). La signalisation des ces récepteurs affecte la prolifération cellulaire, la survie et la différenciation et ces effets sont médiés par les domaines cytoplasmiques de ces récepteurs. La présence de CD30 dans la mastocytose est considérée comme aberrante et a été décrite dans des rapports démontrant une association presque exclusive de cet immunomarqueur avec des formes agressives de mastocytose. La positivité de CD30 dans les formes indolentes de MS, y compris la forme cutanée de mastocytose, est considérée comme exceptionnelle. Afin d'évaluer la prévalence de CD30 dans les mastocytes néoplasiques, nous avons mené une étude rétrospective des cas de MC et de MS dans le Laboratoire d'Anatomie Pathologique de l'Institut du Cancer de l'Université de Toulouse - Oncopole, Toulouse - France entre 2000 et 2006. En plus de l'analyse histopathologique des cas de ces deux formes cliniques, des tests immunohistochimiques ont également été réalisés pour les marqueurs suivants: CD30, CD2, CD25, c-Kit/CD117, en plus d'autres immunomarqueurs. Sur un total de 42 cas de mastocytose, nous avons trouvé 29 cas de MC (n = 29) et 13 cas de MS (n = 13). Le CD30 était positive dans 39 cas au total (39/42 = 92,8%). Dans les cas de MC, 28 cas sur 29 étaient positifs pour CD30. Dans la MS 11 des 13 cas étaient positifs pour CD30. Les cas témoins où les mastocytes mis en évidence dans la peau normale et les mastocytes activés trouvés dans les urticaires, le CD30 était négatif. Les résultats

de cette étude suggèrent que le CD30 peut être considéré comme un marqueur néoplasique de la mastocytose, quel que soit son tableau clinique (cutané ou systémique), mais il n'est pas exclusivement associé aux formes agressives de mastocytose, décrites précédemment dans la littérature.

Mots-clés: Mastocytose - CD30 – immunohistochimie.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS	34
2.1. Objetivo Geral.....	34
2.1. Objetivos Específicos.....	34
3. METODOLOGIA.....	35
4. RESULTADOS	39
Artigo: Prevalence of CD30 immunostaining in neoplastic mast cells. A retrospective immunohistochemical study.....	39
5. DISCUSSÃO GERAL.....	56
6. CONCLUSÃO.....	60
7. REFERÊNCIAS	61
8. ANEXOS	68
Anexo 1: Critérios/achados para as variantes de mastocitose sistêmica:.....	68
Anexo 2: Dispensa de apresentação de projeto de pesquisa para avaliação do sistema CEP-CONEP.....	69
Anexo 3: Inclusão de imagens conforme solicitação de banca examinadora.....	70

1. INTRODUÇÃO

1.1) Definição

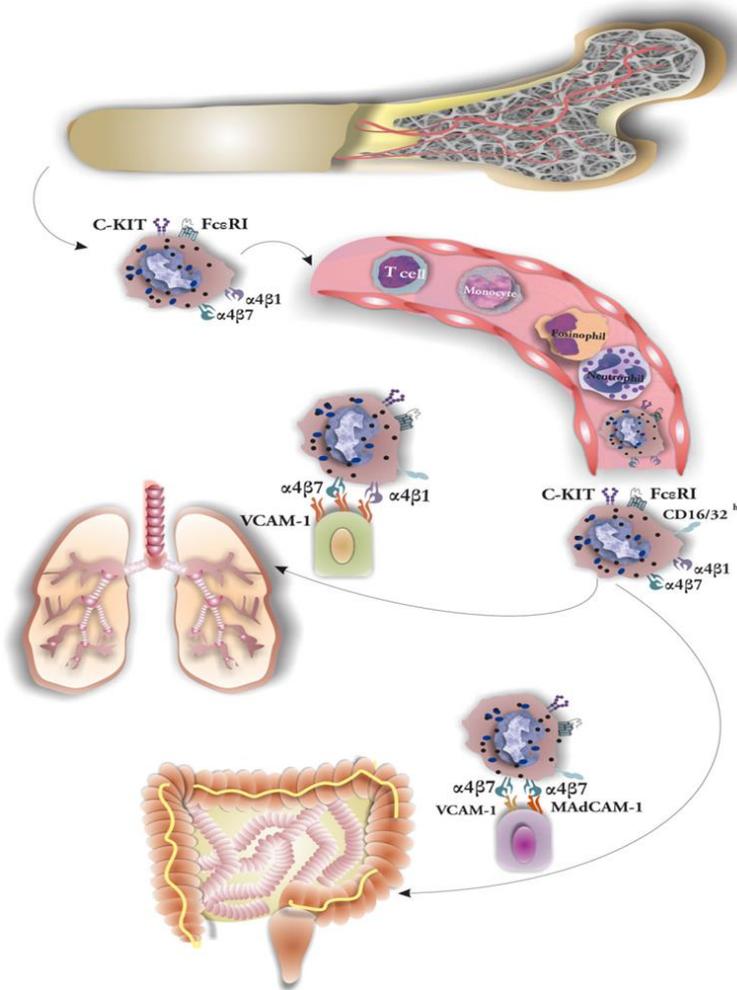
Mastocitose é uma patologia neoplásica envolvendo mastócitos e seus progenitores originados na medula óssea, e caracterizada por crescimento anormal e/ou acúmulo de células mastocitárias clonais em um ou mais órgãos.¹

É uma doença rara muitas vezes subdiagnosticada na população geral uma vez que suas formas de apresentação clínica ainda são pouco conhecidas, também devido ao fato que os seus critérios diagnósticos foram estabelecidos apenas em 2001. Em um estudo populacional realizado em uma região específica da Holanda em 2011, foi estimada uma frequência de mastocitose sistêmica indolente de 13 casos por 100 000 habitantes.²

É uma doença muito heterogênea. Os sintomas são causados pela infiltração da pele pelos mastócitos neoplásicos, no caso de mastocitose cutânea, e/ou de órgãos extracutâneos, incluindo a medula óssea, na mastocitose sistêmica, bem como pela liberação inadequada de mediadores biológicos pelas células mastocitárias.³

1.2) Origem e desenvolvimento das células mastocitárias.

As células mastocitárias se desenvolvem à partir de progenitores originados na medula óssea (CD34+/CD117+). Os progenitores de mastócitos são liberados da medula óssea para a circulação sanguínea. Na circulação eles seguem um padrão controlado de tráfego com o auxílio de interação entre integrinas e seus receptores. Finalmente, eles alcançam os tecidos alvo (pulmão, pele, trato gastrointestinal) onde sob influência de fatores de crescimento, eles amadurecem em mastócitos (Fig 1).⁴



Os progenitores dos mastócitos expressam o receptor tirosina-quinase (KIT-CD117). Normalmente, a interação entre este receptor e o seu ligante, o qual é o fator de células tronco (SCF) induz o desenvolvimento e maturação dos mastócitos nos tecidos alvo. O SCF é produzido por uma variedade de células as quais incluem fibroblastos e células endoteliais.⁴

Em última análise, a interação do SCF com o receptor KIT (CD117) é fundamental para a completa diferenciação e maturação dos mastócitos naqueles tecidos.

1.3) Fisiologia dos Mastócitos.⁴

Os mastócitos são células secretórias do sistema imune inato e desempenham um papel importante na defesa do hospedeiro através da produção e liberação de mediadores pro-inflamatórios e citocinas.

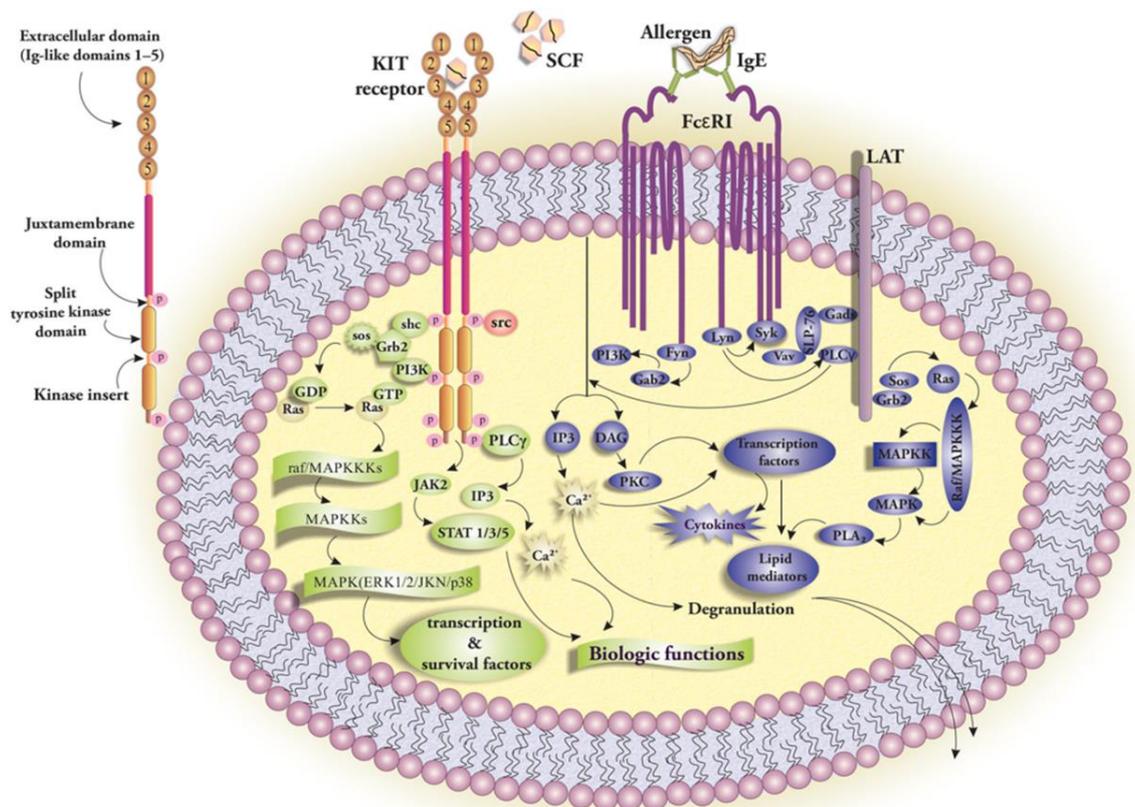
Os mastócitos são células inatas do sistema imune conhecidas pelo seu papel nas reações alérgicas e anafiláticas. Elas funcionalmente podem ser consideradas como uma “faca de dois gumes” com um lado bom e um lado ruim. O lado ruim consiste nas respostas imunes alérgicas através da ativação do seu receptor FcεR1, presente no domínio extracelular, através

da ligação com o complexo IgE-alérgeno. O lado bom é a ação protetora dos mastócitos contra algumas ameaças ambientais, tais como venenos de cobra e insetos, onde a enzima liberada pelos mastócitos (carboxipeptidase) tem um papel importante na degradação destes venenos.

Portanto, as duas principais vias na fisiologia dos mastócitos incluem a sinalização KIT e a FcεR1. Enquanto a primeira via está associada com a sobrevivência e a proliferação celular dos mastócitos, a segunda via tem um papel fundamental na produção e degranulação dos mediadores relacionados com as respostas alérgicas e de defesa do sistema imune.

Com relação à primeira via, a ligação do SCF aos três primeiros domínios Ig-like da região extracelular do KIT, induz alterações estruturais resultando em cascatas de reações químicas que levam à dimerização e fosforilação de regiões intracelulares, resultando na ativação de vias de sinalização celular promovendo a proliferação e maturação dos mastócitos.

A segunda via consiste na ligação do complexo IgE-alérgeno com o receptor FcεR1 desencadeando a degranulação dos mastócitos (Fig 2).⁴



1.4) Diagnóstico histopatológico.

O diagnóstico de mastocitose é tradicionalmente baseado na demonstração de acúmulo focal de mastócitos com características histológicas típicas.³ Os infiltrados densos e focais de mastócitos contendo pelo menos uma proporção de células com aspecto fusocelular podem ser considerado como marca registrada da mastocitose.⁵

Como o mastócito pode ser de difícil identificação nos cortes de rotina corados pela Hematoxilina & Eosina (H&E), um discreto aumento pode ser facilmente ignorado a menos que as colorações especiais metacromáticas como o Giemsa ou o Azul de Toluidina sejam realizadas.⁵

1.5) Diagnóstico imunohistoquímico.

A confirmação diagnóstica com base na morfologia isolada, mesmo com uso de colorações especiais metacromáticas pode ser difícil, exigindo o uso de estudos imunohistoquímicos, bioquímicos ou genéticos.⁶ Diferentes imunomarcadores realizados em tecidos processados têm sido utilizados para a identificação de mastócitos em pacientes com mastocitose.

A triptase é a mais sensível e tem sido proposta como uma importante ferramenta para o diagnóstico de mastocitose.¹ Em todos os casos de suspeita de mastocitose, um painel limitado de anticorpos contra pelo menos três antígenos específicos devem ser aplicados: 1) Anti-triptase: é altamente específica e sensível (com exceção de algumas neoplasias triptase+, mieloblastos e basófilos), e, portanto, permite a triagem tanto para o número de células mastocitárias dispersas, como a detecção imediata de pequenos infiltrados compactos de células mastocitárias.⁷ Porém, em tecidos extramedulares, como por exemplo a mucosa do trato gastrintestinal, a presença de coloração de fundo com a utilização da anti-triptase pode facilmente levar a superestimação do número de células mastocitárias e interpretações errôneas de mastocitose; 2) Anticorpos contra o KIT (CD117) também deve ser realizado para confirmar a presença de células mastocitárias nesses casos.⁸ Embora os anticorpos anti-KIT sejam não específicos, pois o KIT também é expresso em células-tronco hematopoiéticas, melanócitos, células germinativas e células CAJAL, ele tem sido usado por ter sensibilidade superior permitindo a verificação nos casos onde há triptase+ nas células mastocitárias, pois não apresentam reação de fundo significativa;⁹ 3) Anticorpos anti-CD25 que são antígenos específicos expressos em células T ativadas, mas também em certas neoplasias malignas de células B, como a leucemia tricoleucocítica também devem ser realizados em casos de suspeita de mastocitose sistêmica porque as células mastocitárias neoplásicas coexpressam

CD25 enquanto que os mastócitos reativos são negativos para CD25. Logo o CD25 é um critério diagnóstico menor para o diagnóstico de mastocitose sistêmica.¹⁰

O valor diagnóstico do anticorpo anti-CD2 é limitado devido a uma menor sensibilidade para a detecção de células mastocitárias atípicas e devido a presença de células T CD2+ em quase todos os infiltrados teciduais de mastocitose.¹¹

1.6) Diagnóstico Molecular

Na mastocitose sistêmica, a alteração molecular mais frequentemente encontrada é a mutação pontual do gene c-KIT no codon 816 no exon 17, que é caracterizada pela substituição do ácido aspártico pela valina, denominada D816V.¹²

Esta mutação é bastante comum em MS e pode ser encontrada em praticamente todas as formas de MS.¹²⁻¹⁶

Sabe-se que o proto-oncogene c-Kit é expresso em vários tipos de células, incluindo mastócitos normais promovendo o crescimento celular, ativação/ maturação por uma via dependente da fosforilação envolvendo a tirosina quinase.¹⁷ Portanto, uma ativação constituída por mutação neste proto-oncogene causa crescimento anormal de mastócitos em uma MS.

1.7) Classificação das formas de Mastocitose segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS)¹

A classificação de mastocitose segundo a OMS, que é amplamente aceita, inclui três subvariantes principais:

I. Mastocitose cutânea (MC), uma doença benigna na qual a infiltração de mastócitos é confinada à pele. É preferencialmente vista em crianças pequenas, pode estar presente no nascimento e exibe uma tendência acentuada a regredir espontaneamente. Em adultos, a MC usualmente aparece na terceira e quarta décadas de vida. Logo, a MC é uma doença indolente e, por definição, só pode ser diagnosticada quando a MS for excluída por investigações adequadas. Em adultos, uma de biópsia de medula óssea, incluindo análise imuno-histoquímica e molecular, deve sempre ser realizada para avaliar ou excluir MS. A MC é classificada em 3 subtipos: i. Urticária Pigmentosa/mastocitose cutânea maculopapular (UP/MCMP), ii. Mastocitose cutânea difusa e iii. Mastocitoma da pele. A subvariante mais comum de MC apresenta-se como erupção macular ou maculopapular disseminada que é denominada urticária pigmentosa. A mastocitose cutânea difusa é muito menos freqüente e geralmente visto apenas em crianças muito jovens. O mastocitoma solitário ou localizado

também é raro e tem um curso clínico totalmente benigno. A maioria dos tumores de células mastocitárias da pele mostra um curso benigno ou até mesmo se resolvem espontaneamente na puberdade.

II. Mastocitose sistêmica (MS), é caracterizada pelo envolvimento de ao menos um órgão extra-cutâneo com ou sem evidência de infiltração da pele. Ela é geralmente diagnosticada após a terceira década de vida, com uma predileção de sexo masculino sobre o feminino variando de 1 a 1:1.5. Inclui cinco categorias: i. mastocitose sistêmica indolente (a forma mais comum envolvendo principalmente pele e medula óssea); ii. *Smouldering systemic mastocytosis* ou mastocitose sistêmica latente (organomegalia frequentemente encontrada), iii. Uma subcategoria única denominada MS associada à neoplasia hematológica, iv. Mastocitose sistêmica agressiva - geralmente agressiva e apresenta-se sem lesões cutâneas, e v. Leucemia de células mastocitárias, provavelmente representando a variante mais rara de leucemias humanas.

III. A extremamente rara neoplasia extracutânea de células mastocitárias, apresentando-se como sarcoma de células mastocitárias ou denominado como mastocitoma extracutâneo. Classificação sumarizada na tabela 1

OMS – Classificação de Mastocitose (Tabela 1).

Variante - Subvariantes	Abreviação
Mastocitose cutânea	MC
- MC Maculopapular/Urticária Pigmentosa *	MCMP/UP
- MC difusa	MCD
- Mastocitoma da pele	
Mastocitose Sistêmica	MS
- Mastocitose sistêmica indolente	MSI
- Mastocitose sistêmica latente	MSL
- MS associada à neoplasia hematológica	MS-ANH
- MS Agressiva	MSA
- Leucemia de células mastocitárias	LCM
Sarcoma de mastócitos	SM

Os achados para o diagnóstico de mastocitose sistêmica segundo a OMS são baseados em critério maior e critérios menores. O diagnóstico de MS é feito com o critério maior e um critério menor ou três ou mais critérios menores. O critério maior caracteriza-se por infiltrado de mastócitos multifocal e denso (≥ 15 mastócitos agregados) detectado em um corte histológico de medula óssea e/ou órgãos extra-cutâneos.

Critérios menores são: A) Nas biópsias de medula óssea ou outros órgãos extra-cutâneos, identificam-se * $>25\%$ de mastócitos infiltrando e apresentando aspecto fusiforme ou morfologia atípica ou ** $>25\%$ de mastócitos imaturos ou atípicos em aspirados de medula óssea. B) Detecção da mutação no códon 816 do KIT em medula óssea, sangue ou outros órgãos extra-cutâneos. C) Mastócitos em medula óssea, sangue ou outros órgãos extra-cutâneos expressando CD25 com ou sem expressão do CD2 além dos marcadores de mastócitos normais. D) Persistência do aumento dos níveis de triptase total excedendo 20ng/ml na ausência de neoplasia mielóide associada, no qual este parâmetro não é válido. Os critérios sumarizados na tabela abaixo (tabela 2):

Critérios da OMS para Diagnóstico de Mastocitose Sistêmica (Tabela 2)

 Maior: * Infiltrados compactos multifocais de mastócitos na medula óssea ou outros órgãos extra-cutâneos (>15 mastócitos)

Menor: * a. Os mastócitos na medula óssea ou em outro órgão extra-cutâneo apresentando uma morfologia anormal com aspecto fusiforme ($> 25\%$)

b. mutação c-kit D816V em órgão (s) extra-cutâneo (s) **

c. mastócitos na medula óssea expressando CD25 com ou sem expressão do CD2

d. Triptase sérica > 20 ng / ml (porém esse critério deve ser excluído em pacientes com neoplasia mielóide associada).

 * se pelo menos um critério maior e um menor ou três critérios menores forem preenchidos, o diagnóstico de MS pode ser estabelecido

** outras mutações ativadoras no códon 816 do c-kit também contam como um critério menor.

A mastocitose sistêmica indolente (MSI) é a variante mais comum de MS, compreendendo cerca de dois terços de todos os casos. Geralmente, a MSI envolve tanto a pele quanto a medula óssea. A infiltração da medula óssea por vezes pode ser de difícil detecção e em alguns casos só pode ser diagnosticada com estudo imunoistoquímico, incluindo o anticorpo anti-CD25 e estudos moleculares (mutação D816V). A MSI mostra um curso clínico prolongado e em quase todos os pacientes com tempo de sobrevivência de duas décadas ou mais.⁹ No entanto, em um pequeno grupo de pacientes, a transformação em outras categorias da doença, como MS agressiva, ou MS com malignidade hematológica associada podem ocorrer.¹⁸

Na mastocitose sistêmica latente (*smouldering systemic mastocytosis*), a quantidade de mastócitos é elevada, a organomegalia é frequentemente encontrada “Achados B” (critérios/achados no anexo 1) e envolvimento de várias linhagens celulares é tipicamente presente. Embora a evolução clínica é frequentemente estável por muitos anos, a progressão para mastocitose sistêmica agressiva ou leucemia de células mastocitárias pode ocorrer. As lesões de pele são encontradas na maioria dos pacientes e a mutação KIT D816V é quase sempre presente. Ao contrário da mastocitose sistêmica indolente típica, a mutação é usualmente detectada em várias linhagens mielóides e algumas vezes até em linfócitos, o que reflete o envolvimento neoplásico em várias linhagens celulares, a despeito de ausência de evidência morfológica de neoplasia hematológica associada.¹

A mastocitose sistêmica agressiva (MSA) é de longe muito menos comum do que a MSI, compreendendo apenas cerca de 5% de todos os casos de MS. Clinicamente, a MSA pode se apresentar com hepatoesplenomegalia e/ou linfadenopatia, mas geralmente sem lesões cutâneas. A MSA é frequentemente revelada apenas por exame histológico e não suscitado pelo clínico.¹⁹ A MSA é caracterizada pela infiltração progressiva de células mastocitárias em vários órgãos com comprometimento clínico significativo de sua função, incluindo citopenia grave, má absorção, fraturas ósseas e sinais de hepatopatia com perda da função hepática. Tais achados são denominadas “Achados C”¹ (critérios/achados no anexo 1). A infiltração de células mastocitárias levando a organomegalia marcada não deve ser considerada como um “Achados C”, a menos que seja acompanhado de sinais de comprometimento da função do órgão. Organomegalia significativa também é encontrada em pacientes com curso indolente ou latente e representam os “Achados B”¹ (critérios/achados no anexo 1). Uma subvariante rara de MSA com proeminente eosinofilia do sangue e dos tecidos, associado à linfadenopatia generalizada (cl clinicamente imitando o linfoma maligno) tem sido descrito como linfadenopatia mastocitária com eosinofilia.²⁰

Cerca de um quarto a um terço dos pacientes com MS, são diagnosticados com mastocitose associada a neoplasia hematológica (MS-ANH) tornando-se assim o segundo subtipo mais frequente de MS.²¹ Esta variante é um distúrbio único entre as doenças hematológicas na medida em que combina duas histologias e categoria de doenças completamente diferentes em uma definida entidade de MS.²²

A grande maioria (cerca de 80 a 90%) de "ANHs" são distúrbios mielóides incluindo quase todas as entidades de doença definidas como: síndromes mielodisplásicas, síndromes mielodisplásicas/mieloproliferativas, síndromes mieloproliferativas, leucemia mielóide aguda e leucemia mielóide crônica.²³ As mais comuns entre as malignidades mielóides, são os distúrbios do grupo das síndromes mielodisplásicas/mieloproliferativas, geralmente denominados leucemias mielomonocitárias crônicas.²⁴

Malignidades linfóides associadas compreendem apenas cerca de 10 a 20% de todos os "ANHs", sendo os mielomas plasmablasticos os mais frequentes neste grupo. Casos raros de leucemia linfocítica aguda e crônica, bem como leucemia tricoleucocítica, também foram relatados.²¹

O quadro clínico e o prognóstico de pacientes com MS-ANH são determinados principalmente pela "ANH". Os infiltrados em MS só têm sido detectados depois da quimioterapia bem sucedida. Esta condição é provisoriamente denominada "mastocitose oculta".⁹

A leucemia de células mastocitárias (LCM) é extremamente rara e caracterizada pela infiltração leucêmica de vários órgãos por células mastocitárias atípicas.²⁵ A LCM é a única subvariante de mastocitose diagnosticada citologicamente em preparações de esfregaço: o número de células mastocitárias em esfregaços de medula óssea devem exceder 20% de todas as células nucleadas.²⁶

Na maioria dos casos com LCM, são encontradas células mastocitárias circulantes. Em LCM típica, as células mastocitárias compõem mais de 10% das células do sangue, enquanto que variantes "aleucemicas" de LCM são raras. O prognóstico de pacientes com LCM é grave.²⁶ O mais importante diagnóstico diferencial a ser considerado é a leucemia mielomastocítica.⁹

As proliferações de células mastocitárias localizadas também são extremamente raras e incluem tanto mastocitoma extracutâneo (do pulmão) e o "verdadeiro" sarcoma de células mastocitárias do qual menos de cinco casos foram publicados.²⁷⁻²⁹ Como a atipia citomorfológica do sarcoma de células mastocitárias geralmente é muito alta (como de um sarcoma de grau 3), é impossível obter o diagnóstico correto sem estudo imuno-histoquímico

adequado. Vale ressaltar que os sarcomas de células mastocitárias mais relatados ocorreram em tecidos não comumente envolvido por MS (laringe, cólon e meninge). Todos os casos mostraram progressão e generalização com uma fase terminal semelhante a da leucemia de células mastocitárias.⁹

As recomendações práticas para os procedimentos diagnósticos em pacientes com suspeita de mastocitose são sumarizadas na tabela abaixo (tabela 3).

Sinais iniciais/Sintomas	Procedimentos Diagnóstico Recomendados
Lesões cutâneas UP-like em casos pediátricos	1. Biópsia de pele (com análise do c-kit D816V) e triptase sérica (monitorização) * Investigação da medula óssea em casos com suspeita de doença hematológica / MS
Lesões cutâneas UP-like em pacientes adultos	1. Exames de medula óssea, biópsia de pele e dosagem de triptase sérica (> 20 ng / ml na maioria dos casos) 2. No caso de MS → estadiamento completo: trato gastrointestinal, osteodensitometria, raio-x dos ossos, ultrassonografia do abdome, hemograma completo, bioquímica sanguínea, parâmetros de coagulação, mutações c-kit
Sintomas relatados, mas sem lesões cutâneas (UP) **	1. Triptase sérica, se > 20 ng / ml 2. Exame da medula óssea, se MS 3. MS - Estadiamento**
Reação alérgica inexplicável grave / anafilaxia na apresentação	1. Triptase sérica, se > 20 ng / ml 2. Repetir a triptase sérica algumas semanas depois: se então, a triptase sérica é > 20 ng / ml 3. Exame da medula óssea, se MS 4. MS - Estadiamento**

* Em lactentes jovens, um nível sérico de triptase ligeiramente superior a 20 ng / ml não é considerado um indicador seguro para a mastocitose sistêmica. Portanto, recomenda-se aguardar e monitorar o nível sérico de triptase ao longo do tempo nesses pacientes (mas não realizar uma punção na medula óssea), a menos que sejam encontrados outros sinais de uma doença hematológica sistêmica (organomegalia, osteólise, citopenias graves, outros).

** Especialmente em pacientes com desordens mastocitárias agressivas, as lesões cutâneas estão ausentes. Portanto, é de fundamental importância conhecer o subtipo de MS nesses pacientes o mais rápido possível. Em MS agressiva, o nível sérico de triptase é geralmente maior do que em pacientes com mastocitose isolada da medula óssea (frequentemente <20 ng/ml).

Subvariantes raras de mastocitose e diagnósticos diferenciais com ênfase especial em síndromes de sobreposição mielomastocítica.⁹

Síndromes de sobreposição mielomastocítica:⁹

Por definição, as síndromes de sobreposição mielomastocítica incluem uma variedade de malignidades mielóides, algumas ainda mal definidas, com sinais proeminentes de diferenciação em direção à linhagem de mastócitos, mas não preenchendo critérios para mastocitose.

É importante notar que as síndromes de sobreposição mielomastocítica não podem ser detectadas, a menos que os marcadores imuno-histoquímicos relacionados ao antígeno mastocitário sejam aplicados, tais como a triptase, quimase, CD117 (KIT), e o CD25. A sobreposição mielomastocítica pode ser detectada através de estudo imuno-histoquímico e/ou nível molecular. Recentemente, pode-se mostrar que os mastócitos clonais expressando mutação de ponto de ativação típica D816V para KIT também carregam o ponto de ativação da mutação V617F para JAK-2.

Outras doenças que podem ser colocadas sob o título de uma sobreposição mielomastocítica incluem: triptase+ em leucemia mielóide aguda, neoplasias mielóides com D816V (KIT), neoplasias mielóides com mastócitos CD25+, FIP1L1-PDGFR leucemia alfa+eosinofílica, MS-ANH e mastocitose "oculta". Na experiência dos autores, todos os casos de malignidades mielóides D816V+ (geralmente leucemia mielóide aguda) provaram ser mastocitose "oculta" (MS-ANH) quando foram realizadas análises imuno-histoquímicas apropriadas.⁹

Subvariantes raras de mastocitose:⁹

a. Mastocitose Sistêmica Bem Diferenciada (MSBD): é uma subcategoria da MSI. Infiltrados compactos de mastócitos consistindo exclusivamente de células mastocitárias hipergranuladas e com aparência madura (mastócitos arredondados). Pertencem ao espectro do chamado infiltrado de células redondas positivas para triptase na medula óssea, denominado TROCI-bm (tryptase-positive round cell infiltrate of the bone marrow).³⁰ Morfologicamente, a MSBD pode ser separado da MS "comum" pela ausência de expressão de CD25 nas células mastocitárias e ausência de mutação típica no exon 17. O único caso publicado de MSBD relatou uma mutação pontual única de c-kit dentro do domínio transmembrana (F522P) que não conduziu à resistência ao imatinibe.³⁰

b. Síndrome de Ativação de Mastócitos Monoclonais: esta desordem compreende um grupo de pacientes apresentando clinicamente episódios recorrentes de anafilaxia, sem lesões cutâneas e apenas um ou dois critérios diagnósticos menores para MS, mas faltando o critério maior. Nesta condição, células mastocitárias podem apresentar atipia citomorfológica, expressão aberrante de CD25 ou presença de mutação D816V, mas todas as três características (que seriam suficientes para o diagnóstico de MS) não são detectáveis.³¹

c. Mastocitose Oculta: pode ser uma forma rara dentro do espectro do MS-ANH que será detectada após a erradicação da "ANH" por quimioterapia e, em seguida, retrospectivamente, pode ser encontrada na biópsia inicial. Isto só pode ser observado após imuno-histoquímica e análise molecular.⁹ Apesar de remissão hematológica, infiltrados de MS persistem ou mesmo progridem, sinalizando que ainda uma parte do processo neoplásico ainda está presente.³² Por outro lado, foi possível analisar tecidos que haviam sido removidos anos antes do diagnóstico de MS. Embora não houvesse evidência morfológica de um infiltrado tecidual por mastócitos, a análise molecular revelou a presença de uma mutação ativadora de c-kit até 10 anos antes da manifestação de MS.⁹

d. Leucemia Mielomastocítica: representa uma rara neoplasia mielóide geralmente uma síndrome mielodisplásica do tipo RAEB (anemia refratária com excesso de blastos) ou mesmo leucemia mielóide aguda por critérios da OMS exibindo mais de 10% de células imaturas metacromáticas (frequentemente blastos metacromáticos) em medula óssea ou esfregaço de sangue, mas não preenchendo critérios para diagnóstico de MS. Provavelmente, a maioria dos casos de leucemia mielomastocítica são citomorfologicamente diagnosticados como leucemia basofílica aguda sem história histopatológica e análise imunofenotípica de um espécime de biópsia de medula óssea. Histologicamente, há uma abundância de triptase (ou

raramente, quimase), mas há não há infiltrados compactos de células mastocitárias, ou fenótipo aberrante de células mastocitárias com coexpressão de CD25 e nem mutação de ponto de ativação de c-kit.⁸ Na maioria dos casos de leucemia mielomastocítica, é detectado um aumento significativo de células progenitoras/blastos CD34+.³³ A leucemia mielomastocítica é melhor categorizada como um subgrupo dentro das síndromes de sobreposição mielodisplásicas/mieloproliferativas.⁹

e. Leucemia Mielóide Aguda Triptase+: também é um achado raro e caracterizado pela forte expressão da triptase e, menos frequentemente, do KIT (CD117) por mieloblastos em uma leucemia mielóide aguda (subtipos FAB M1, M2 ou M4-*eo*).⁹ Leucemia Mielóide Aguda tryptase+ não possui critério suficiente para o diagnóstico de MS.³³ A diferenciação entre a leucemia mielóide aguda e a leucemia mielomastocítica, ambas triptase+, é possível pela contagem de células metacromáticas no sangue e/ou esfregaços de medula óssea, no qual a presença de mais de 10% de células metacromáticas com sinais de diferenciação de células mastocitárias favorece o diagnóstico de leucemia mielomastocítica.³⁴

f. Leucemia Basofílica: é uma subvariante extremamente rara de leucemias mielóides e não pode ser diagnosticada histologicamente em amostras de biópsia por agulha da medula óssea. A leucemia basofílica também pertence ao espectro do TROCI (tipo difuso), uma vez que pode ser demonstrado que os basófilos neoplásicos expressam quantidades detectáveis de triptase no estudo imuno-histoquímico.⁹ O diagnóstico definitivo só é possível quando anticorpos relacionados a basófilos 2D7 e/ou BB1 são usados na análise imuno-histoquímica de um espécime de biópsia de agulha.³⁵ Em contraste com os grânulos de células mastocitárias, os grânulos metacromáticos de basófilos são solúveis em água e, portanto, não podem ser detectados em tecidos fixados em formol rotineiramente processados. Na maioria dos casos publicados de leucemia basofílica, a doença de base foi classificada como leucemia mielóide crônica Ph+. Recentemente, um caso único de leucemia basofílica secundária em um paciente com leucemia mielóide crônica Ph+ com MS associada foi diagnosticado retrospectivamente em uma análise de quase 200 casos de leucemia mielóide crônica usando anticorpos contra 2D7 e BB1, respectivamente.⁹

1.8) Terapêutica da Mastocitose:³⁶

O tratamento da mastocitose tem dois objetivos: conter os sintomas de liberação de mediadores mastocitários e reduzir a infiltração específica de órgãos acometidos em certas formas clínicas.

Dado que a cura não é ainda possível na maioria dos casos e que não modificam habitualmente a evolução clínica da doença, há novas abordagens moleculares para a doença como terapia alvo usando inibidores da tirosina kinase para reduzir a morbidade.

1.8.1 Precauções gerais³⁶

É aconselhado aos pacientes, para evitar as crises mastocitárias ou o choque anafilático, uma atenção particular com certos alimentos e medicamentos, exercícios físicos intensos e variações térmicas brutais. A utilização de kit de adrenalina é recomendado para estes pacientes.

1.8.2 Tratamento sintomático³⁶

A terapia essencialmente sintomática é adaptada a cada caso.

Os anti-histamínicos anti-H1 associados aos anti-H2 são tratamentos-chaves, de primeira intensão, para bloquear as vias dos receptores mastocitários.

O cromoglicato de sódio é um estabilizador de membrana de mastócitos que tem uma atividade sobre as manifestações digestivas e sobre o prurido, assim como os inibidores de leucotrienos.

A associação com a aspirina visa inibir a síntese de prostaglandinas e é por vezes utilizada quando há falha dos tratamentos precedentes, notadamente quando há hipotensão recidivante. O risco de desenvolver uma degranulação mastocitária (5%), às vezes mortal, justifica este tipo de tratamento em ambiente hospitalar e utilizando doses mínimas.

A adrenalina em perfusão (4µ/min) e sobretudo pela auto-injeção (após treinamento do paciente) é indicada em casos de doença severa ou em casos de choque anafilactóide.

A corticoterapia tem apenas um efeito temporário. A prednisona é usada em doses iniciais de 1mg/kg/dia em casos de malabsorção ou de ascite. O *bolus* de metilprednisolona não é mais efetivo que a prednisona. A corticoterapia enteral do tipo Budesonida pode ser proposta em casos de acometimento digestivo e tem mostrado boa eficácia.

Os bisfosfonatos são utilizados por via intravenosa em casos de fraturas osteoporóticas recentes e dolorosas. Os alendronatos via oral ou os risedronatos monossódicos com suplementação de cálcio são prescritos em casos de osteoporose confirmados por densitometria (Tscore<2,5DS).

1.8.3 Tratamentos dermatológicos³⁶

A PUVAterapia é um tratamento clássico das mastocitoses cutâneas, sobretudo na forma de urticária pigmentar. O tratamento diminui a extensão das lesões da urticária pigmentar e do prurido, limitando o sinal de Darier espontâneo, tendo uma durabilidade de 5 a 8 meses. Esse tratamento é temporário, com risco carcinogênico à longo prazo.

UVA-1 terapia diminui o número de lesões e do número de mastócitos na derme, melhorando o prurido. A UVB terapia pode ser eficaz no prurido mas não há observações descritas.

Os dermocorticóides, o laser vascular ou o laser Yag são descritos no tratamento da urticária pigmentosa, mas não há grandes séries publicadas.

1.8.4 Tratamentos imunomoduladores e citoredutores³⁶

Esses tratamentos têm efeitos secundários e pode causar mutações, devendo serem prescritos com cautela.

O interferon alpha é frequentemente considerado como a droga de primeira linha nas mastocitoses sistêmicas agressivas com o sem acometimento hematológico subjacente. Várias publicações relataram a sua eficácia pela diminuição não somente da liberação dos mediadores mastocitários mas igualmente da infiltração específica. Embora o efeito antiproliferativo é moderado, as recidivas são frequentes nos meses após a interrupção do tratamento e a tolerância é baixa (depressão e distúrbios neuropsíquicos). Dessa forma o interferon alpha é proposto a forma de mastocitose latente.

Cladribina, análogo das bases purinas, habitualmente utilizada na leucemia tricoleucocítica ou na histiocitose Langheransiana grave trouxe resultados encorajadores na mastocitose sistêmica.

As quimioterapias são habitualmente ineficazes na mastocitose e a resposta ao tratamento depende do prognóstico da doença hematológica subjacente nos casos de mastocitose associadas à hemopatias.

1.8.5 Inibidores das tirosinas kinases³⁶

Desde a chegada do mesilato de imatinibe (Glivec®) no tratamento da leucemia mielóide crônica onde ele modificou o prognóstico, os inibidores da tirosina kinase foram propostos para o tratamento das mastocitoses sistêmicas. Eles apresentam resultados promissores tanto em pacientes portadores do KIT selvagem e do KIT mutante.

1.9) Mastocitose e a expressão da molécula CD30:

Tradicionalmente o CD30 é expresso em várias patologias malignas hematológicas³⁷⁻⁴⁰ (conforme tabela 4)

<u>TIPO DE TUMOR</u>	<u>COMENTÁRIOS</u>
ALCL (Anaplastic Large Cell Lymphoma)	As células tumorais são positivas para CD30 (marcação de membrana). Intensa imunomarcação observada em grandes células
HD (Hodgkin Disease)	Em NLPHL (Nodular Lymphocyte Predominant Hodgkin Lymphoma) as células tumorais são negativas para CD30 (positiva em raros casos). No CHL (Classical Hodgkin Lymphoma) as células tumorais são positivas para CD30.
DLBCL (Diffuse Large B-cell Lymphoma)	Embora a grande maioria de "anaplastic large B-cell lymphoma" expressarem CD30, casos de non-anaplastic podem ocasionalmente marcar para CD30
PTCL (Peripheral T-cell lymphoma)	CD30 pode ser expresso pelas células tumorais da variante grande células. Ocasionalmente células CD30 positivas estão presentes, embora isso no T-cell lymphoma possa ser considerado como CD30 negativo.
True histiocytic tumours (Histiocytic Sarcoma)	Células tumorais podem ocasionalmente expressar o CD30.
Embryonal Carcinoma	As células tumorais mostram reatividade para o CD30.
Follicular Lymphoma	A expressão do CD30 pode ser encontrada em alguns centroblastos/centrócitos do linfoma folicular.

O CD30 pertence a uma super família de receptores NGF/TNF envolvidos na sinalização celular, em particular células linfóides ativadas. O CD30 foi relatado repetidamente como negativo na doença mastocitária, com exceção de um único relato.³⁸

2.0) A molécula CD30

O receptor CD30 e o seu ligante CD30L (CD153) são membros da superfamília do fator de necrose tumoral (TNF) e exibem expressão reduzida em subpopulações de células T e células B ativadas em condições não patológicas, entretanto a expressão do CD30 é

aumentada em várias malignidades hematológicas incluindo no linfoma de Hodgkin.⁴¹ A molécula CD30 é um receptor protéico com domínios extracelular, transmembrana e intracelular, tendo peso estimado em 105-120kDa, e codificados por 8 genes (TNFRSF-8) estes estão localizados no braço curto do cromossomo 1 (1p36).^{42,43} A porção intracelular da molécula contém vários sítios de fosforilação os quais regulam a sinalização após a ligação com este receptor. O CD30 é composto por 577 aminoácidos incluindo 365 aminoácidos na região extracelular, 24 aminoácidos no segmento transmembrana e 188 aminoácidos no domínio citoplasmático.⁴⁴ Estruturalmente, o CD30 humano é composto por seis repetições ricas de cisteína no domínio extracelular, o que é característico desta família, interposto por repetições parciais de 60 aminoácidos.⁴² Uma forma com peso de 85kDa do CD30, o qual é um produto da sua clivagem denominado sCD30 pode ser encontrado no plasma de pacientes com linfomas ou doenças autoimunes.⁴⁵

O ligante CD30 (CD30L) é uma proteína transmembrana única, composto de 234 aminoácidos do tipo II, com um peso estimado em 26kDa e pertence à superfamília do TNF sendo o único ligante conhecido para o CD30, o seu gene foi mapeado no braço longo do cromossomo 9 (9q33).⁴⁶ O RNA que transcreve para o CD30L é detectado em células B, células T ativadas, macrófagos, granulócitos, eosinófilos e em algumas linhagens de células T positivas para o HTLV-1.^{47,48} Em nível protéico, o ligante CD30 é expressado em células T ativadas no sangue periférico, células B, neutrófilos, monócitos e macrófagos.⁴⁹

2.1) A fisiologia do CD30

A ativação do CD30 em resposta à estimulação pelo seu respectivo ligante CD30L ou ligação cruzada por outros anticorpos induz à trimerização e recrutamento de proteínas sinalizadoras. Devido à ausência de domínio enzimático intrínseco dentro da cauda citoplasmática do CD30, a transdução do sinal é exclusivamente mediada por membros da família do fator associado ao receptor de necrose tumoral (TRAF) e várias proteínas ligadas ao TRAF. Os níveis intracelulares do TRAF2 são alterados pela ligação do CD30 com o seu ligante.^{50,51}

A sinalização mediada pelo CD30 envolve múltiplas vias incluindo as quinases MAP e a via NF- κ B (Nuclear Factor kappa B).^{52,53}

NF- κ B é uma família de fatores de transcrição que regula um grande número de genes os quais estão envolvidos em importantes processos fisiológicos, incluindo sobrevivência celular, inflamação e respostas imunes. Mais recentemente a expressão da via NF- κ B tem sido associada com vários tipos de câncer e ainda microorganismos e bactérias contribuem na

ativação desta via em tumores, confirmando o papel multifatorial deste fator de transcrição como um “drive” do câncer.⁵⁴ Cinco genes codificam a família dos fatores de transcrição: NFKB1, NFKB2, RELA, RELB e REL; os produtos protéicos os quais são p50, p52, p65 (RelA), RelB e c-Rel, respectivamente. NFKB1 e NFKB2 são expressados como precursores p105 e p100, os quais são clivados em fatores de transcrição funcional p50 e p52, respectivamente.⁵⁵ Os membros da NF-kB são expressos de maneira ubíqua, mas suas funcionalidades podem depender de um específico estímulo celular.⁵⁶ A ativação da via NF-kB pode ser iniciada por um grande número de estímulo extracelulares, mas eles têm uma cascata de transdução de sinal similar, a qual resulta basicamente na transferência de fosfato. Esta sinalização compreende as vias canônica (clássica) e não canônica (alternativa).⁵⁴ Na via canônica, os dímeros NF-kB são regulados por moléculas inibitórias da família do I κ B, as quais previnem a sua translocação para o núcleo. Para liberar o complexo NF-Kb, as vias de sinalização são ativadas por receptores de citocinas pró-inflamatórias, como o receptor de fator de necrose tumoral (TNRF), receptor IL-1 (IL-1R) e os membros da família receptor toll-like (TLR) os quais são (TRL3, TRL4, TLR7); receptores antígenos como o receptor de células T (TCR), receptor de células B (BCR) e membros da família dos receptores de fatores de crescimento (EGFR). Estes receptores ativam o complexo kinase I κ B (IKK alfa, IKK beta, IKK gama), os quais degradam a molécula inibidora do complexo NF-kB (a I κ B), e subsequentemente os dímeros p65/p50 e c-Rel/p50 são então translocados para o núcleo e ativam a expressão do gene alvo.⁵⁷ Uma característica importante dos linfomas e leucemias é a expressão constitucional do complexo NF-kB. Este complexo é altamente expressado nas células da leucemia mielóide aguda primária bem como nas células tronco leucêmicas, mas não é expressado nas células hematopoiéticas normais.⁵⁸ A expressão constitucional do NF-kB inibe a apoptose das linhagens das células Reed-Sternberg no linfoma de Hodgkin, estimulando então a proliferação celular. Estas células mostram expressão constitucional das subunidades p65 e p50.⁵⁹

A ativação do CD30 estimula a expressão da superfamília NF-kB, o que influencia então a proliferação celular inibindo a apoptose. De um modo paradoxal, dependendo dos tipos celulares e de sinais co-estimulatórios envolvidos, os eventos na transdução do sinal mediado pelo CD30 são capazes de promover proliferação celular, sobrevida celular ou podem ter efeito anti-proliferativo e mesmo provocar a morte celular. Por exemplo, a indução da sinalização do CD30 nas células do linfoma anaplásico de grandes células por um anticorpo anti-CD30 leva à apoptose celular devido à redução seletiva do

TRAF2 e de sua impossibilidade de ativar a via NF- κ B;⁶⁰ entretanto o mesmo anticorpo anti-CD30 pode induzir a proliferação na doença de Hodgkin e em outras linhagens celulares.⁶¹

2.2) CD30 e mastocitose

Em condições fisiológicas, a expressão do CD30 é restrita a uma pequena população de células, mas pode ser induzida em uma variedade de células incluindo leucócitos e linfócitos.⁶²

Durante o período neonatal, a expressão transitória do CD30 é frequente em uma grande variedade de tecidos embrionários.⁶³ Os mastócitos não expressam o CD30 em condições fisiológicas.⁶³

Conforme discutido nos parágrafos anteriores, apenas poucos marcadores característicos os quais incluem o KIT, CD25, CD2 são expressos pelos mastócitos neoplásicos e então podem ser utilizados como critério diagnóstico. Como estes marcadores diagnósticos são identificados em mastócitos neoplásicos em todos os subtipos sistêmicos de mastocitose, eles não podem ser utilizados como discriminadores entre os diversos tipos de mastocitose sistêmica, as quais têm evoluções e prognósticos distintos.

Em 2011, Sotlar e colaboradores descreveram uma série de casos de um estudo imunohistoquímico nos quais o CD30 estava presente na maioria dos pacientes com mastocitose sistêmica de alto grau enquanto os mastócitos neoplásicos na maioria dos pacientes com mastocitose sistêmica indolente eram CD30 negativo.⁶⁴ Estes autores discutiram que o achado foi inesperado visto que o CD30 é uma molécula expressada em um número limitado de malignidades. Adicionalmente, neste mesmo trabalho, o CD30 não foi detectado na medula óssea normal ou reativa nem em outras neoplasias hematopoiéticas de linhagem não mastocitária.

A demonstração imuno-histoquímica da expressão do CD30 predominantemente nas variantes agressivas da mastocitose poderia ter consequências importantes. O CD30 poderia então ser considerado como um potencial marcador de agressividade da mastocitose sistêmica e então ser utilizado para o rastreamento de doença avançada, ou até ser uma ferramenta para estimar o risco de progressão da mastocitose sistêmica. Entretanto aqueles mesmos autores (Sotlar e colaboradores⁶⁴), destacaram que o CD30 foi encontrado em alguns pacientes nos quais o curso clínico da mastocitose sistêmica foi estável e de maneira contraditória, em alguns pacientes cujo CD30 era negativo nos mastócitos neoplásicos houve uma progressão pejorativa e rápida.

Estes achados relacionando a presença do CD30 com os subtipos agressivos de mastocitose sistêmica, poderiam então embasar a utilização de terapias com drogas anti-CD30, as quais têm sido utilizadas no tratamento de linfomas Hodgkin e linfoma anaplásico de grandes células.⁶⁵

Efetivamente, a utilização de Brentuximab Vedotin o qual é um conjugado anticorpo-droga direcionado à molécula CD30 tem sido relatada em inibir a proliferação de mastócitos neoplásicos e induzir a sua apoptose naqueles pacientes cujas células eram CD30 positivas.⁶⁶ Em outro relato, o conjugado Brentuximab-Vedotin foi associado à redução da carga de mastócitos neoplásicos e resposta duradoura durante mais de 3 anos, em 3 pacientes com mastocitose sistêmica agressiva ou indolente.⁶⁷ Em contraposição aos achados de Sotlar e colaboradores, em um estudo realizado por Morgado e colaboradores,⁶⁸ as formas agressivas de mastocitose não mostraram níveis mais elevados de CD30 em comparação às formas indolentes. Estes autores argumentaram que essa diferença utilizando a citometria de fluxo, a qual é mais sensível em comparação à imuno-histoquímica.

A paucidade de estudos sobre a presença do marcador imuno-histoquímico CD30 em mastócitos neoplásicos bem como uma certa discrepância entre os achados na literatura com relação à prevalência do CD30 nas formas agressivas e formas não agressivas da mastocitose nos levou a realizar esta pesquisa retrospectiva da molécula CD30, utilizando imuno-histoquímica, em mastócitos neoplásicos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar a expressão do marcador imuno-histoquímico, molécula CD30/Ki1 em mastocitoses cutânea e sistêmica assim como em urticárias banais e pele com infiltrado de células mastocitárias.

2.1. Objetivos Específicos

Descrever o perfil imunofenotípico do marcador CD30 em mastocitoses cutânea e sistêmica.

Descrever o perfil imunofenotípico do marcador CD30 em urticárias e peles com infiltrado de células mastocitárias.

Distinguir as mastocitoses tumorais e infiltrados de células mastocitárias (não tumorais) com a imunomarcção da molécula CD30/Ki1.

3. METODOLOGIA

Para o estudo em questão, foram elencados todos os casos de mastocitoses cutânea e sistêmica. Estes casos foram pareados e grupos controles foram utilizados com peles normais e urticárias. O estudo tem base retrospectiva, para tanto foram avaliados todos os casos de mastocitoses cutânea e sistêmica de 2000 à 2006 do Centro Hospitalar Universitário de Toulouse – França. Os casos foram pareados e grupos comparativos foram utilizados, como peles normais e urticárias.

3.1. Seleção dos Sujeitos

Foram incluídos os casos:

- Com diagnóstico de mastocitose cutânea e sistêmica;
- Peles com diagnóstico de urticária e peles normais (retiradas de procedimentos estéticos);
- Que apresentem todos os dados e materiais biológicos para a pesquisa;
- Todos os casos que estavam de acordo com o rígido controle do Comitê de Ética em Pesquisa do país (França), procedimentos éticos padrão (Declaração de Helsinque).

Critérios de exclusão

Foram excluídos os casos com algum dos critérios abaixo:

- Ausência de material biológico, para as pesquisas moleculares;
- Blocos de parafina não disponíveis no arquivo;
- Ausência de informações clínicas.

3.2. Coleta de dados clínicos: dados clínicos relevantes como idade, estadiamento, terapêutica utilizada, presença de remissão completa ou não, presença de recidivas e ocorrência de óbito foram colhidos dos prontuários dos pacientes, preenchidos por ocasião do atendimento pela equipe da Dermatologia do Centro Hospitalar Universitário de Toulouse – França.

3.3. Avaliação morfológica e classificação da mastocitose: em cortes de parafina, evidenciam-se os mastócitos com as colorações de Giemsa ou o Azul de Toluidina, utilizando a técnica de citoquímica: reação de cloracetato esterase (CAE). Os marcadores imunohistoquímicos têm uma maior importância no diagnóstico. A avaliação histológica foi realizada por dois patologistas especialistas em Dermatopatologia e Hematopatologia do

Centro Hospitalar Universitário de Toulouse – França e Faculdade de Ciências Médicas – Unicamp

Classificação da mastocitose:

- a. Mastocitose cutânea
 - a.1 urticaria pigmentosa/mastocitose cutânea maculopapular
 - a.2 mastocitose cutânea difusa
 - a.3 mastocitoma da pele
- b. Mastocitose sistêmica
 - b.1 mastocitose sistêmica indolente
 - b.2 mastocitose sistêmica latente
 - b.3 mastocitose sistêmica associada à neoplasia hematológica
 - b.4 mastocitose sistêmica agressiva
 - b.5 leucemia de células mastocitárias
- c. Sarcoma de mastócitos

3.4. Realização das reações de imunoistoquímica: para essa etapa, as amostras tiveram tempo de fixação controlado em formalina tamponada a 10%. As reações de imunohistoquímica para CD20, CD79a, CD3, CD4, CD43, CD30, ALK1 (anaplastic lymphoma kinase), Ki61 (MIB-1), EMA (epitelial membrane antigen), CD1a, CD68 (KP-1 & PG-M1), CD117 (c-kit), Lisosima, LAT (linker for activation of T cells), IgA, IgG, IgM, Kappa, Lambda, CD138, CD56, CD2, CD5, CD8, S-100, Melanosome, TdT, LSP1, CD45, vimentina, CD34 e CD25 foram realizadas em cortes inteiros de tecido parafinado no Centro Hospitalar Universitário de Toulouse – França. Foram utilizados os anticorpos listados na tabela 5 para a realização da técnica feita nos cortes dos blocos de parafina (secções de 3 µm de espessura) dispostos em lâminas silanizadas acondicionadas em máquinas Ventana ES ou Benchmark XT immunostainer (Ventana, Tucson, AZ).

Tabela 5: Anticorpos utilizados na reação de imuno-histoquímica

ANTÍGENO	FABRICANTE	CLONE	DILUIÇÃO	ESPECIFICIDADE
CD20	Dako	L26	1 :50	linfócitos B
CD79a	Oxford	JCB117	1 :10	linfócitos B
IgA	Dako	A092 Poly	1 :2000	células B
IgG	Dako	A424 Poly	1 :2000	células B
IgM	Dako	A426 Poly	1 :2000	células B
Kappa	Dako	A192 Poly	1 :8000	linfócitos B
Lambda	Dako	A194 Poly	1 :8000	linfócitos B
CD3	Dako	A452 Poly	1 :100	linfócitos Pan T
CD138	Dako	M115	1 :100	plasmócitos
CD56	Novocastra	1B6	1 :100	células NK
CD2	Novocastra	AB75	1 :50	linfócitos T / células NK
CD4	Novocastra	1F6	1 :50	células T-helper, monócitos
CD5	Novocastra	4C7	1 :50	linfócitos T
CD8	Oxford	C8/144	1 :10	linfócitos T supressores
CD30	Dako	BerH2	1 :50	células T and B ativadas, ALCL*
ALK1**	Oxford	3NPA134	1:2	ALCL*
Ki-67 (MIB1)	Dako	MIB-1	1:50	proteína nuclear
EMA***	Dako	E29	1:50	células epiteliais
S-100	Dako	Z311	1:500	melanócitos
Melanosome	Dako	HMB-45	1:50	melanócitos
CD43	Biotest	MT1	1:50	linfócitos T
CD1a	Immunotech	O10	1:1	células dendriticas
CD68 (KP-1)	Dako	KP1	1:100	histiócitos/ macrófagos
CD68 (PG-M1)	Dako	PGM1	1:100	histiócitos/ macrófagos
CD117 (c-kit)	Dako	A4502	1:100	Mastócitos de tecidos epiteliais e hematopoiéticos

Lysosyma	Dako	A099	1:100	histiócitos/macrófagos
TdT [†]	Dako	A3524 Poly	1:25	precursores de células linfóides
LSP1 ^{††}	Oxford	LSP1	1:10	linfócitos, neutrófilos e macrófagos
CD45	Dako	2B11+PD7/ 26	1:25	linfócitos B e T
Vimentina	Dako	V9	1:100	Células de origem mesenquimal
LAT ^{†††}	Dako	LAT-1	1:10	células NK, células T, megacariócitos e mastócitos
CD34	Coulter	QBEND10	1:100	células mielóides
CD25	Dako	ACT-1	1:25	monócitos/macrófagos

ALCL*, anaplastic large cell lymphoma; ALK1**, anaplastic lymphoma kinase; EMA***, epithelial membrane antigen; TdT[†], terminal deoxynucleotidyl transferase; LSP1 ^{††}, lymphocyte-specific protein 1; LAT^{†††}, linker for activation of T cells.

3.5. Avaliação dos marcadores imuno-histoquímicos: a avaliação dos dados imunofenotípico foi realizada com a leitura em microscópico óptico.

4. RESULTADOS

Artigo: Prevalence of CD30 immunostaining in neoplastic mast cells. A retrospective immunohistochemical study.

Comprovante de aceite do artigo

From: Medicine <em@editorialmanager.com>

Date: 2018-04-12 15:51 GMT-03:00

Subject: Medicine® MS# MD-D-18-00766R1: Editor Decision

To: GEISILENE RUSSANO DE PAIVA SILVA <geisi.paiva@gmail.com>

CC: tournier.e@chu-toulouse.fr, luis.sarian@gmail.com, livideanu.c@chu-toulouse.fr, delsol.g@chu-toulouse.fr, lamant.l@chu-toulouse.fr, vassallomeister@gmail.com, brousset.p@chu-toulouse.fr, laurent.c@chu-toulouse.fr

ACCEPTANCE NOTIFICATION

RE: MD-D-18-00766R1, entitled "Prevalence of CD30 immunostaining in neoplastic mast cells. A retrospective immunohistochemical study."

Dear Dr. RUSSANO DE PAIVA SILVA,

It is a distinct pleasure to inform you that your manuscript has been accepted for publication in Medicine®.

* Per journal office policy, please note editorial changes may be made to your manuscript to conform to the journal's established style. These changes will be grammatical and stylistic changes only.

** Payment of the article processing charge (APC) (or a request for an invoice) MUST be completed before production of your article can begin.

Please follow these steps to pay the APC:

Go to <http://wolterskluwer.qconnect.com>

Create a log in for the website.

Under “Select a title”, choose Medicine (MD)(0025-7974) from the list of journals.

When filling out your article information, please make sure to select the license type you selected when submitting your License to Publish form.

Please note that you should only submit through this site once. Multiple orders will result in duplicate billing. If you have any questions about a payment you have submitted or how to submit the payment, please contact us.

* Once payment of the APC is received (or an invoice is requested), proofs of the article should be distributed within 4-5 weeks.

Thank you for contributing this notable addition to academic literature through the vehicle of Medicine®!

Sincerely,

Medicine® Editorial Office

E-mail: medicine@wolterskluwer.com

Prevalence of CD30 immunostaining in neoplastic mast cells. A retrospective immunohistochemical study.

Geisilene Russano de Paiva Silva MD^{a,d,*}, Emilie Tournier MD^{a,b}, Luis Otávio Sarian MD, PhD^d, Cristina Bulai-Livideanu MD^c, Georges Delsol MD^{a,b}, Laurence Lamant MD, PhD^{a,b}, José Vassallo MD, PhD^d, Pierre Brousset MD, PhD^{a,b,e}, Camille Laurent MD, PhD^{a,b,e}.

^a UMR U.1037, Centre de recherche sur cancer de Toulouse, Université Paul-Sabatier, Toulouse, France

^b Department of Pathology, Institut Universitaire du Cancer de Toulouse-OncoPole, Toulouse, France

^c Department of Dermatology, Paul Sabatier University, Mastocytosis National Reference Center (CEREMAST), Toulouse University and CHU, Toulouse , France.

^d Laboratory of Molecular and Investigative Pathology - LAPE, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas Medical School, Campinas, Brazil.

^e Laboratoire d'Excellence Labex-TOUCAN, Toulouse-France

The authors GRdPS, ET, LOS, CBL, GD, LL, JV, PB, and CL were equally involved in acquisition of data, analysis, and interpretation of data, drafting of de manuscript, critical revision of de manuscript for important intellectual content, statistical analysis, technical, and material support of this study.

The authors have no conflicts of interest to disclose.

*Corresponding author: Geisilene Russano de Paiva Silva, MD.

Laboratory of Molecular and Investigative Pathology - LAPE, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas Medical School (UNICAMP).

Rua Alexander Fleming, 101. Campinas-SP 13083-881 Brazil.

Phone number: +551935219408

E-mail address: geisi.paiva@gmail.com

Abbreviations: ASM = aggressive systemic mastocytosis, CM = cutaneous mastocytosis, MCs = mast cells, MCL = mast cell leukemia, MCS = mast cell sarcoma, SM = systemic mastocytosis, urticaria pigmentosa (UP)/maculopapular cutaneous mastocytosis (MPCM)
WHO = World Health Organization.

Abstract

Mastocytosis is a rare disease characterized by clonal neoplastic proliferation of mast cells (MCs). It ranges from skin lesions as cutaneous mastocytosis (CM) which may spontaneously regress to highly aggressive neoplasms with multiorgan involvement corresponding to some aggressive systemic mastocytosis (ASM), mast cell leukemia (MCL) and/or mast cell sarcoma (MCS).

There is increasing evidence of CD30 expression in neoplastic MCs of the bone marrow. This expression has been described almost exclusively in aggressive forms of systemic mastocytosis (SM).

The aim of the present study is to evaluate CD30 expression both in cutaneous and systemic forms of mastocytosis. Forty-two mastocytosis cases were reviewed, including cutaneous (n=29) and systemic (n=13) forms to assess the prevalence of CD30 expression. Thirty-nine out of 42 (92.8%) cases were CD30 positive. In cases of CM, 28/29 (96.5%) cases were CD30 positive, 11/13 cases of SM (84.6%) were positive for CD30. MCs in normal skin biopsies and in urticaria lesions were CD30-negative. This study found that CD30 is also frequently expressed in CM as well as in systemic forms. This finding is a major departure from the prevailing concept that CD30 expression is often related to aggressive systemic forms of mastocytosis.

Keywords: Mastocytosis, CD30, cutaneous mastocytosis, immunohistochemistry.

1. Introduction

Mastocytosis is a rare disease with an estimated frequency of 1:1000-8000.^[1] Mastocytosis is defined as a clonal accumulation/proliferation of mast cells (MCs) that infiltrate one or more organs. The etiology of the disease remains unknown and its manifestations are heterogeneous, ranging from isolated skin lesions that may spontaneously regress as cutaneous mastocytosis (CM) to highly aggressive neoplasm associated with multi-visceral involvement and sometimes with short survival times found in aggressive systemic mastocytosis (ASM), mast cell leukemia (MCL) and mast cell sarcoma (MCS).^[2]

The diagnosis of mastocytosis is based on the histopathologic demonstration of clusters of neoplastic MCs in the involved organ. After the histologic diagnosis, the different variants of mastocytosis can be recognized by applying the World Health Organisation (WHO) 2017 criteria for therapeutic and prognostic purposes.^[3]

The major criterion for SM is the presence of multifocal dense aggregates of ≥ 15 MCs detected in sections of bone marrow and/or other extracutaneous organs. The minor criteria are: a) Atypical morphology or spindle shapes in >25 percent of the MCs in bone marrow sections, bone marrow aspirate, or other extracutaneous tissues; b) Mutational analysis of Kit showing a 816 mutation codon (eg. Asp816Val) in bone marrow, blood, or extracutaneous organs; c) bone marrow or other extracutaneous MCs expressing the surface markers CD2, CD25, or both; d) Baseline serum tryptase levels >20 ng/mL. The final diagnosis of SM will be rendered if the major criterion plus one of the minor criteria or three minor criteria are fulfilled.^[3]

Immunomarkers are useful tools for the diagnosis of mastocytosis because sometimes it may be difficult to discriminate between true mastocytosis and MCs hyperplasia.^[3]

MCs express CD117 and tryptase antigens^[4] and may exhibit CD63 and CD69 activation-associated antigens.^[5] Others markers related to complement-related cells surface antigens are expressed in a high proportion of SM cases, e.g. CD11b/CR3, CD11c/CR4, CD35/CR1, CD55/DAF, CD59/MIRL and CD88/C5aR.^[5]

CD30 is a transmembrane glycoprotein belonging to the tumor necrosis factor superfamily. CD30 is expressed in activated or proliferating B and T cells, but it is absent from or very weak in normal tissues. Expression of CD30 has been demonstrated in non-lymphoid and lymphoid neoplasms, like Hodgkin lymphoma.^[6] A recent work has demonstrated that CD30 is frequently expressed in the aggressive form of mastocytosis

raising the hypothesis of a specific association.^[7-10] However, the study by Morgado et al.^[11] using flow cytometry analysis, showed that CD30 expression in bone marrow MCs was detected in both aggressive and indolent disease.

Due to the clinical impact of the differential diagnosis between indolent (as CM) and aggressive forms of mastocytosis, this retrospective study proposes to evaluate the presence of CD30 immunomarker in a series of MCs lesions.

2. Materials and Methods

2.1. Inclusion criteria

We retrieved, from medical files of the Pathology Department of CHU Purpan (Toulouse, France), clinical and pathological data from 42 mastocytosis cases treated from 2000 to 2006.

The histopathological slides were reviewed by two senior pathologists that are specialized in skin diseases. CD30 and CD117 immunohistochemical analysis was additionally performed in all cases. The histopathological analysis and the CD30 immunostaining were also done in a control group comprising of 5 normal skin samples from various parts of the body (retrieved from plastic surgery procedures) and 16 cases of urticaria.

2.2. Histopathological analysis

The skin biopsies from mastocytosis were fixed in formalin solution (three cases) and the remaining 39 cases were fixed in Bouin's solution. After paraffin embedding, 4 µm thick tissue sections were stained with hematoxylin and eosin, Giemsa and toluidine blue. The urticaria skin control lesions were fixed in Bouin's solution (9 cases) and 7 cases were fixed with formalin solution. The 5 cases of normal skin control were fixed with Bouin's solution (3 cases), and formalin solution in 2 cases.

2.3. Immunohistochemistry

For immunohistochemistry, 3-µm-thick sections were tested using a Ventana BenchMark XT immunostainer (Ventana, Tucson, AZ). Immunohistochemistry using avidin-biotin complex was performed using the panel of the following antibodies: CD30 (BerH2, 1:50; Dako), CD117 (c-Kit) (A4502, 1:100; Dako) and in 25 patients CD2 immunostaining (AB75, 1:50; Novocastra) was performed. In one patient with atypical presentation, a larger panel of immunomarkers was performed (not shown).

The intensity of CD30 and CD117 immunostaining was graded as: negative (0), weak (+), intermediate (++) and strong (+++). The percentage of CD30 positive cells examined was defined as negative, low (<10%), intermediate (10-50%) and high (>50%).

2.4. Molecular analysis for the detection of c-Kit mutation

In one case of systemic mastocytosis, due to its atypical immunohistochemical presentation (positive CD30), a molecular analysis for the detection of c-Kit mutation was carried out.

Total RNA was extracted from frozen skin biopsies using the RNeasy mini kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). Complementary DNA was synthesized by using random hexamers as a primer from 200ng of total RNA. ProStar First-Strand RT-PCR kit (Stratagene, La Jolla, CA) was used, consuming a total volume of 25 µl as recommended by the manufacturer. Then, 2.5µl of cDNA was introduced in each PCR reaction. The c-Kit gene was amplified by polymerase chain reaction (PCR) using HotStarTaq™ DNA polymerase (Qiagen, Courtaboeuf, France). A total of 40 cycles were performed using the Gene Amp PCR System 2700 or 9700 (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) at 94°C for 30 seconds, 57°C for 30 seconds and 72°C for 45 seconds. The sequences of c-Kit coding were amplified from complementary DNA with the PCR by using primer pairs indicated in Table 1. Direct amplicon sequencing was carried out after the purification of the PCR products with the Minelute PCR purification kit (Qiagen). They were directly sequenced with BigD dye® terminator V 1.1 (Applied Biosystems) and an ABI PRISM 3100® sequencer (Applied Biosystems) and analyzed with the Seqscape software (Applied Biosystems). D816V mutation (exon 17) was also tested by restriction digest analysis with BsmA1 and PleI restriction enzymes that detect wild types or mutated forms respectively. Fluorescent primers (U2F & L1F, see Table 1 and Table 2) were used for PCR reactions and size of restriction digest fragments were directly determined on a 16 capillary sequencer (ABI Prism 3100 sequencer) with the GeneMapper software (Applied Biosystems). Primer positions are indicated by the c-Kit sequence published through the NCBI accession number X06182.

3. Results

3.1. Clinical patients

Data from 42 cases of mastocytosis were retrieved from the files. Twenty-nine cases corresponded to CM and thirteen cases to SM according to the WHO 2017 criteria.^[3]

Concerning CM, the patients' ages varied between 2 and 13 years-old in 11 cases and in 18 cases there was a wide range between 25 and 78 years-old. In cases of SM, the ages varied between 31 and 85 years-old.

Until today, the available clinical data of 28 patients with CM did not disclose evolution any case of CM that proceed to SM. In one case of CM, there was no available data.

3.2. CD117 immunostaining in neoplastic and reactive MCs

In CM and SM, the neoplastic MCs were strongly positive for CD117 in 100% of MCs. There was no difference in intensity of staining between CM and SM. Neoplastic cells were distributed diffusely in the dermis. In normal and urticaria skin biopsies, all reactive MCs were CD117 positive but with a weak staining. These cells were rare and scattered compared to neoplastic MCs counterpart and were almost always located surrounding blood vessels.

3.3. CD30 immunostaining in neoplastic and reactive MCs

Out of the 42 cases of mastocytosis, 39 cases (92.8 %) were positive for CD30. In two cases CD30 was not readable (SM). In one case CD30 was negative (CM). All tested cases of SM (n=11/13) were positive for CD30 with a CD30 staining ranged from 10% to 50% of MCs in 7 cases and with a CD30 staining in more than 50% of MCs in 3 cases. Except for one case, all CM cases (n=28/29) were CD30 positive (96.5%). In 16 CM, CD30 staining was positive in 10% to 50% MCs and in 11 cases CD30 was positive in more than 50% of MCs. In only one case of CM, CD30 was positive in less than 10% of MCs.

Regarding the intensity of CD30 immunostaining in CM forms 16 cases were graded as weak, 8 cases were intermediate, and 4 cases were strongly positive (Fig. 1).

From 28 cases of positive CD30 in CM, 22 cases presented clinically as urticaria pigmentosa (UP)/maculopapular cutaneous mastocytosis (MPCM), 2 cases as diffuse cutaneous mastocytosis and 2 cases as solitary mastocytoma of skin. In two remaining cases, there was no clinical information about the CM subtype. CD30 staining was present: a) in more than 50% of MCs in 7 cases of UP/MPCM, in one case of diffuse cutaneous mastocytosis and 2 cases of solitary mastocytoma of skin; b) CD30 staining between 10% and 50% of MCs in 14 cases of UP/MPCM and one case of diffuse cutaneous mastocytosis; c) CD30 staining in less than 10% of MCs was found in one only case of UP/MPCM. The CD30 immunostaining intensity was graded as: a) weak in 14 cases of UP/MPCM and in one case of solitary mastocytoma, b) moderate in 6 cases of UP/MPCM, in one case of diffuse

cutaneous mastocytosis and mastocytoma each, c) strong in 2 cases of UP/MPCM and in one case of diffuse cutaneous mastocytosis.

The intensity of CD30 immunostaining in the SM cases was weak in 9 cases, intermediate in 1 case and strong in the latter case (Fig. 2).

By contrast, the reactive MCs of normal skin biopsies (n=5) did not express CD30. Likewise, CD30 was also negative in reactive MCs of urticaria skin lesions (n=16) (Fig. 3).

CD30 positivity was found in both fixative groups (Bouin and Formalin).

Demographic data, mastocytosis subtypes and immunohistochemical results of all 42 patients are shown in table 3.

3.4. Molecular analysis for the detection of c-Kit mutation

Due to a very atypical morphological presentation in one case of SM, the presence of the D816V mutation was searched and established. That unexpected case led to the retrospective research of CD30 immunostaining in all the other cases.

4. Discussion

Mastocytosis is a rare disease^[1] with a highly heterogeneous behavior that varies in which skin lesions could spontaneously regress or become an aggressive neoplasms with pejorative prognosis.^[2,3,12] Due to this extremely variable behavior of mastocytosis, an important question is to identify patients with favorable outcome from those with pejorative prognosis despite of the standard therapies. The immunohistochemical studies might play a role in the diagnosis process of atypical cases and could help to identify mastocytosis patients with pejorative outcome.

Different suitable immunohistochemical markers in histopathology routine have been proposed for the identification of neoplastic MCs. Examples include tryptase and other MCs-related antigens such as chymase, CD117, CD68, CD2 and CD25. In addition to these markers, CD30 could also be useful especially in atypical mastocytosis cases as illustrated in our series. The CD30 expression in occasional MCs, as previously reported,^[13,14] led us to do a retrospective search for CD30 expression in mastocytosis.

CD30 is considered a member of the tumor necrosis factor receptor superfamily and found in neoplastic cells as embryonal carcinoma, Hodgkin lymphoma, anaplastic large cell lymphoma, and in some cases of extramedullary myeloid sarcoma.^[7]

Sotlar and Valent^[7,15] were able to demonstrate CD30 immunostaining in patients having ASM and MCL and they postulated that CD30 could be a marker of worse prognosis. They also demonstrated low or even absent CD30 expression in patients with indolent mastocytosis.

The detection of CD30 in neoplastic MCs in indolent forms of mastocytosis have been rarely described.^[11] Although there is no reliable biomarker that correlates with the prognosis, a possible relationship between CD30 expression and a worse outcome has been described almost exclusively in aggressive forms of SM.^[7] To investigate the prognosis value of CD30 in mastocytosis, we tested CD30 immunostaining in a retrospective series of CM and SM patients.

Our results showed that CD30 expression was present in the majority of mastocytosis cases independently of their systemic and cutaneous presentation. However, CM cases showed a higher percentage of CD30 positive cells than SM. In addition, MCs in CM showed a higher intensity of CD30 staining with a stronger expression of this marker in the 14.2% of CM cases as compared to those found in SM. This finding deviates from those reported previously, in which prevailed negative or infrequent CD30 immunostaining in cases of CM.^[7,16,17]

The significance of tumoral CD30 expression is yet a matter of debate. CD30 expression can be associated with a malignant phenotype, or reflect the recruitment of an inflammatory milieu that enhances tumor growth and survival.^[18] One could argue that CD30 positivity in CM might be the result of MCs activation or allergy and not be related to CM oncogenesis. In order to answer to that question, we tested both normal skins and urticaria lesions, which were CD30 negative nonetheless.

One could speculate that CD30 may be involved in a specific signalling pathway in neoplastic MCs and could be a potential therapeutic target in mastocytosis. Indeed, phase I and II trials^[18] demonstrated that the monoclonal antibody brentuximab vedotin yielded meaningful control of Hodgkin Lymphoma, peripheral T-cell Lymphoma, cutaneous T-cell Lymphoma, and even in cases of SM.^[10] These findings illustrate that CD30 is a potential target for the treatment of mastocytosis.

5. Conclusion

In this study, CD30 was found to be frequently positive in mastocytosis regardless of its clinical presentation. However, we found a higher percentage of positive MCs and stronger staining intensity in CM subtypes. These findings suggest that CD30 is a marker of neoplastic MCs and not exclusively present in aggressive forms of the disease as previously reported.

References

- [1] Fine HF, Akin C, Hematti P, et al. Presumed choroidal and orbital mastocytosis. *Arch Ophthalmol.* 2001;119:1716-1719.
- [2] Maric I, Calvo KR. Mastocytosis: the new differential diagnosis of CD30-positive neoplasms. *Leuk Lymphoma.* 2011;52:732-733.
- [3] Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. *Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues.* Lyon: IARC Press; 2017.
- [4] Kirsten N, Tournier E, Lepage B, et al. Immunohistochemical staining for diagnosis of cutaneous mastocytosis. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2017;31:160-162.
- [5] Escribano L, Diaz-Agustin B, Lopez A, et al. Immunophenotypic analysis of mast cells in mastocytosis: When and how to do it. Proposals of the Spanish Network on Mastocytosis (REMA). *Cytometry B Clin Cytom.* 2004;58:1-8.
- [6] Schwab U, Stein H, Gerdes J, et al. Production of a monoclonal antibody specific for Hodgkin and Sternberg-Reed cells of Hodgkin's disease and a subset of normal lymphoid cells. *Nature.* 1982;299:65-67.
- [7] Sotlar K, Cerny-Reiterer S, Petat-Dutter K, et al. Aberrant expression of CD30 in neoplastic mast cells in high-grade mastocytosis. *Mod Pathol.* 2011;24:585-595.
- [8] van Anrooij B, Kluin PM, Oude Elberink JN, Kluin-Nelemans JC. CD30 in systemic mastocytosis. *Immunol Allergy Clin North Am.* 2014;34:357-364.
- [9] Borate U, Mehta A, Reddy V, Tsai M, Josephson N, Schnadig I. Treatment of CD30-positive systemic mastocytosis with brentuximab vedotin. *Leuk Res.* 2016;44:25-31.
- [10] Blatt K, Cerny-Reiterer S, Schwaab J, et al. Identification of the Ki-1 antigen (CD30) as a novel therapeutic target in systemic mastocytosis. *Blood.* 2015;126:2832-2841.

- [11] Morgado JM, Perbellini O, Johnson RC, et al. CD30 expression by bone marrow mast cells from different diagnostic variants of systemic mastocytosis. *Histopathology*. 2013;63:780-787.
- [12] Lim KH, Tefferi A, Lasho TL, et al. Systemic mastocytosis in 342 consecutive adults: survival studies and prognostic factors. *Blood*. 2009;113:5727-5736.
- [13] Molin D, Fischer M, Xiang Z, et al. Mast cells express functional CD30 ligand and are the predominant CD30L-positive cells in Hodgkin's disease. *Br J Haematol*. 2001;114:616-623.
- [14] Gatter KC, Delsol G, Warnke RA, Pezzella F. *Lymphoproliferative Disease*. Chichester: Blackwell Publishing Ltd; 2012.
- [15] Valent P, Sotlar K, Horny HP. Aberrant expression of CD30 in aggressive systemic mastocytosis and mast cell leukemia: a differential diagnosis to consider in aggressive hematopoietic CD30-positive neoplasms. *Leuk Lymphoma*. 2011;52:740-744.
- [16] Moonim MT, Kossier T, van Der Walt J, Wilkins B, Harrison CN, Radia DH. CD30/CD123 expression in systemic mastocytosis does not correlate with aggressive disease. *Blood*. 2012;120:1746.
- [17] Chiu A, Orazi A. Mastocytosis and related disorders. *Semin Diagn Pathol*. 2012;29:19-30.
- [18] van der Weyden CA, Pileri SA, Feldman AL, Whisstock J, Prince HM. Understanding CD30 biology and therapeutic targeting: a historical perspective providing insight into future directions. *Blood Cancer J*. 2017;7:603.

Name of the ex17 primers	Nucleotide Sequence	localization (bp)
2295s & 2295sF	GGATGACGAGTTGGCCCTAGA	2295 to 2315
2661r & 2661rF	GTAGAAACTTAGATCGACCGGCA	2639 to 2661
2647r (sequencing)	CGACCGGCATTCCAGGATAG	2628 to 2647

Table 1: Primer positions are indicated by the c-Kit sequence published through the NCBI accession number X06182.

Nested ex17 primers and sequencing	Nucleotide Sequence	localization (bp)
2341s	TACCAGGTGGCAAAGGGCATG	2341 to 2362
2600r	CTTCCTAAAGAGAACAGCTCC	2600 to 2621

Table 2: Primer positions are indicated by the c-Kit sequence published through the NCBI accession number X06182.

Case	Sex	Age	CD30 intensity	CD30 staining	CD117 intensity	CD117 staining	Mastocytosis subtypes
1	F	38	-	0	+++	100%	cutaneous
2	M	9	++	30%	+++	100%	cutaneous
3	F	13	+	50%	+++	100%	cutaneous
4	M	38	+	10%	+++	100%	cutaneous
5	M	47	+	10%	+++	100%	cutaneous
6	M	61	++	90%	+++	100%	cutaneous
7	M	46	+	5%	+++	100%	systemic

8	M	31	+++	100%	+++	100%	systemic
9	M	38	NA	NA	+++	100%	systemic
10	M	61	+	10%	+++	100%	systemic
11	F	82	+	10%	+++	100%	systemic
12	M	71	+	10%	+++	100%	systemic
13	M	72	++	40%	+++	100%	cutaneous
14	M	50	+	10%	+++	100%	cutaneous
15	M	50	+++	100%	+++	100%	cutaneous
16	M	64	+	50%	+++	100%	cutaneous
17	M	29	+	10%	+++	100%	cutaneous
18	M	42	+	10%	+++	100%	cutaneous
19	M	5	+++	100%	+++	100%	cutaneous
20	M	50	+	10%	+++	100%	systemic
21	M	60	+	10%	+++	100%	systemic
22	F	41	+	10%	+++	100%	cutaneous
23	F	6	+	60%	+++	100%	cutaneous
24	F	32	+	10%	+++	100%	cutaneous
25	F	78	++	70%	+++	100%	cutaneous
26	F	85	+	60%	+++	100%	systemic
27	M	10	+++	100%	+++	100%	cutaneous
28	F	59	++	40%	+++	100%	cutaneous
29	F	57	NA	NA	+++	100%	systemic
30	F	65	+	10%	+++	100%	systemic
31	F	7	+	100%	+++	100%	cutaneous
32	F	4	+++	100%	+++	100%	cutaneous
33	M	25	+	20%	+++	100%	cutaneous
34	M	70	+	50%	+++	100%	systemic
35	M	60	++	100%	+++	100%	systemic
36	M	5	++	100%	+++	100%	cutaneous

37	F	27	+	40%	+++	100%	cutaneous
38	F	5	+	30%	+++	100%	cutaneous
39	F	41	+	10%	+++	100%	cutaneous
40	M	8	++	100%	+++	100%	cutaneous
41	F	34	+	5%	+++	100%	cutaneous
42	F	2	++	100%	+++	100%	cutaneous

Table 3- Cases demography, immunohistochemical results and their distribution related to the subtype of mastocytosis subtype.

NA = not available; intensity = negative (-), weak (+), intermediate (++), strong (+++).

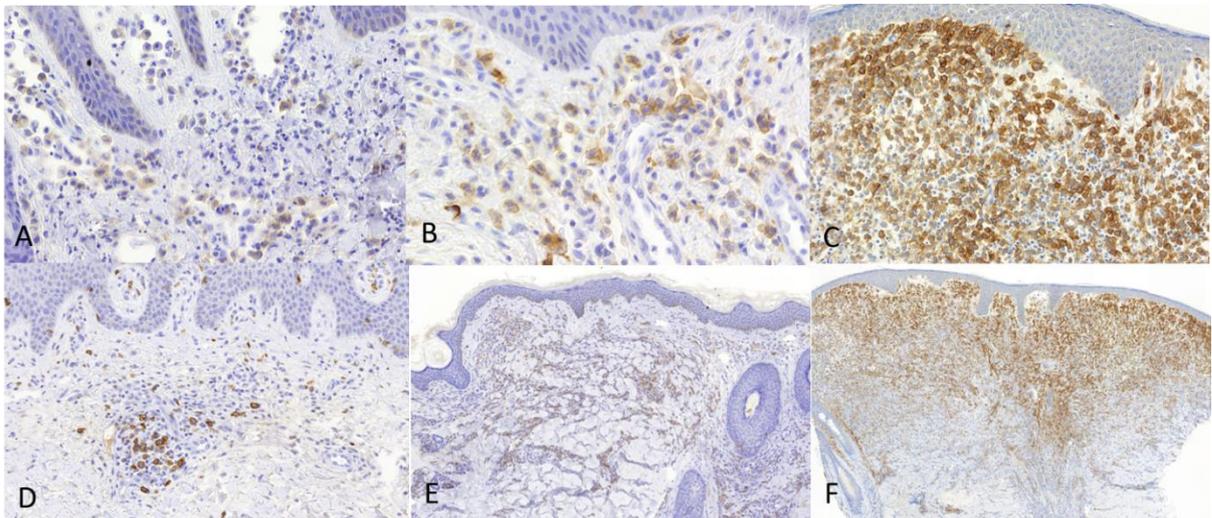


Figure 1. Infiltrate of neoplastic MCs in cases of CM at different CD30 intensity and extension of immunostaining. (A) A weak CD30 immunostaining, magnification x400. (B) An intermediate CD30 immunostaining, magnification x400. (C) A strong CD30 immunostaining, magnification x200. (D) CD30 staining in less than 10% of MCs, magnification x200. (E) CD30 staining between 10% and 50% of MCs, magnification x100. (F) CD30 staining in more than 50% of MCs, magnification x50. MCs = mast cells, CM = cutaneous mastocytosis.

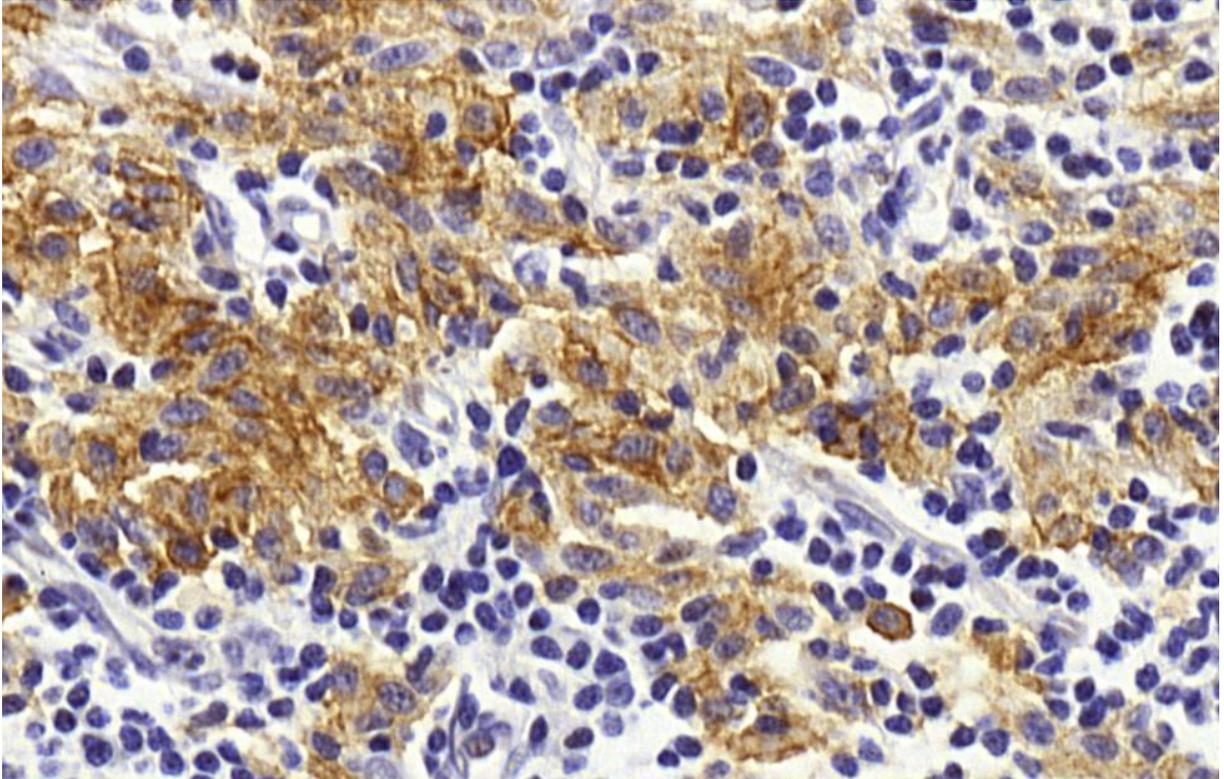


Figure 2. A strong CD30 immunostaining in MCs from a case of SM, magnification x600.
MCs = mast cells, SM = systemic mastocytosis.

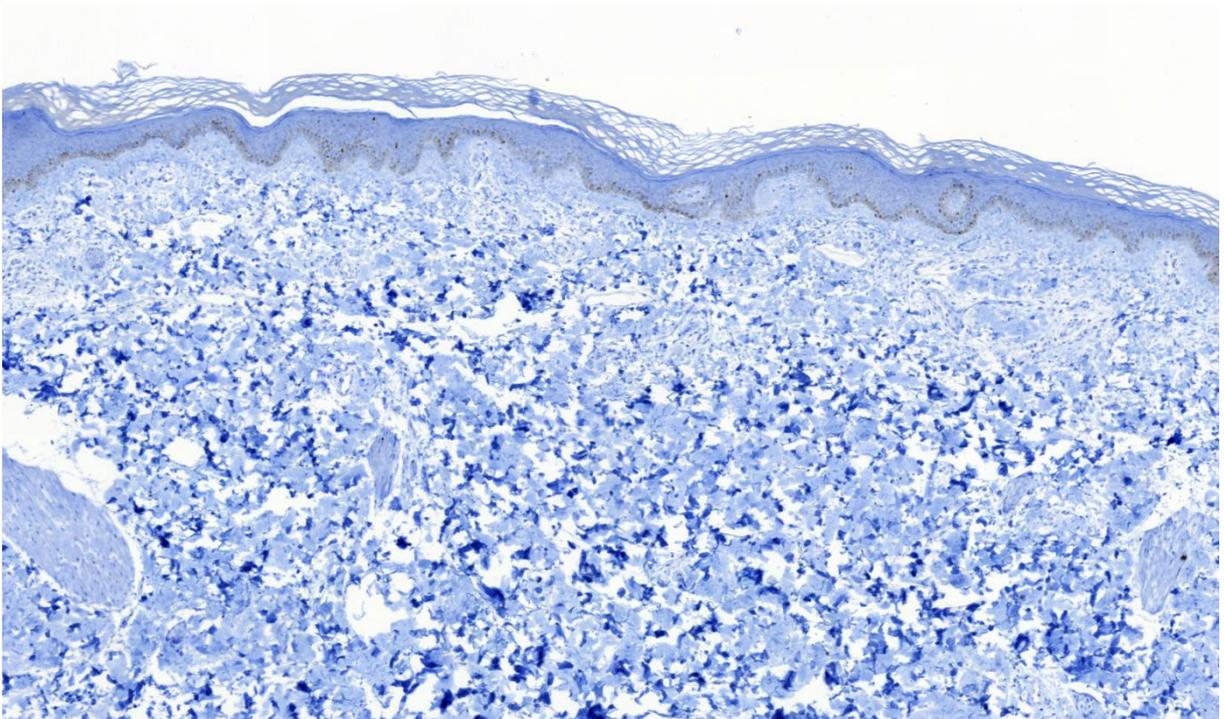


Figure 3. An urticaria lesion negative for CD30 immunostaining, magnification x 40.

5. DISCUSSÃO GERAL

A mastocitose é uma doença rara² com um comportamento altamente heterogêneo que varia entre lesões cutâneas que podem regredir espontaneamente ou se tornar uma neoplasia agressiva com prognóstico pejorativo^{1,69,70}

As formas clínicas de mastocitose são categorizadas pela classificação da OMS¹ e na qual são bem definidas os subtipos cutâneos da Mastocitose que apresentam evolução benigna na maioria dos casos, até mesmo com resolução espontânea em alguns deles, e os subtipos sistêmicos onde há um espectro amplo de evolução clínica no qual a mastocitose sistêmica indolente representa a forma considerada com bom prognóstico, dentro outros subtipos, e a leucemia de células mastocitárias que tem o pior prognóstico.

Os dados sobre a história natural da mastocitose cutânea em crianças dependem principalmente de pesquisas retrospectivas. E em um estudo retrospectivo de longo prazo no qual foram reexaminados pacientes que tiveram diagnóstico de mastocitose cutânea há 20 anos, foi encontrada cura completa em 67% dos casos, regressão importante em 20% e regressão parcial em 20% dos casos.⁷¹ Neste estudo o único fator prognóstico para persistência de doença foi a presença de agregados de células mastocitárias na medula óssea em 3 pacientes. Já em pacientes com início da mastocitose cutânea em idade adulta a persistência da doença é mais típica e a regressão das lesões cutâneas ocorre apenas em alguns casos. O único fator prognóstico encontrado de regressão de lesões cutâneas em mastocitose cutânea maculo-papular no adulto foi a idade acima de 50 anos.⁷²

Na mastocitose sistêmica a evolução é mais heterogênea quando comparada à mastocitose cutânea. Na forma de mastocitose sistêmica indolente, após o surgimento dos sintomas clínicos e deterioração, uma fase estável é vista na maioria das crianças e dos adultos.⁷³

O prognóstico de pacientes com mastocitose sistêmica indolente de início na idade adulta foi avaliado em um estudo de 145 pacientes consecutivos e com um intervalo de 147 meses. Os resultados mostraram que a doença ficou estável na maioria dos pacientes com apenas 3% dos pacientes que evoluíram da mastocitose sistêmica indolente para a formas mais agressivas, e o risco cumulativo de progressão da doença foi calculado em 1,7% em 10 anos.⁷⁴ Os sinais de progressão foram : tryptase sérica acima de 200ng/ml, osteoporose, organomegalias.

Considerando a raridade da doença, com taxa de incidência estimada em 1:10000⁷² e o comportamento extremamente variável das formas clínicas de mastocitose, em

que a progressão de um subtipo com evolução mais favorável para outro com evolução desfavorável se faz baseado principalmente em dados clínicos como o surgimento de organomegalias, o aumento da triptase sérica denotando uma maior carga de mastócitos, seria importante discriminar pacientes que terão uma evolução favorável da doença daqueles com prognóstico pejorativo apesar das terapias direcionadas. Os estudos imuno-histoquímicos poderiam ter um papel tanto na etapa de diagnóstico, notadamente nos casos atípicos e quanto em ajudar a identificar pacientes com mastocitose com desfecho pejorativo.

Diferentes marcadores imuno-histoquímicos utilizados na rotina histopatológica têm sido propostos para a identificação de mastócitos neoplásicos. Exemplos incluem a triptase e outros antígenos como a quimase, CD117, CD68, CD2 e CD25, sendo o CD2 e CD25 critérios diagnósticos menores de mastocitose sistêmica.¹

O CD30 é considerado um membro da superfamília de receptores do fator de necrose tumoral e encontrado classicamente em células neoplásicas como linfoma de Hodgkin, linfoma de grandes células anaplásicas.⁷⁵ Outras neoplasias que expressam o CD30 são alguns subtipos de linfoma não-Hodgkin, carcinomas embrionários e seminomas.⁷⁶

A expressão do CD30 em tecidos normais ou em estados reativos é restrita a poucos tipos celulares, como numa pequena proporção de linfócitos representados por blastos T e B, e dentre as células T, o CD30 é expresso preferencialmente pelas células T helper, notadamente as células Th2.^{77,78}

Dados recentes na literatura demonstraram que o CD30 foi detectado no citoplasma e na superfície de mastócitos neoplásicos nas formas sistêmicas da mastocitose.^{68,79,80} Estes achados foram importantes pois, como descrito anteriormente, a molécula CD30 é expressa em um número limitado de neoplasias.

Nos trabalhos de Sotlar e Valent^{79,80} demonstrou-se que imunomarcagem para o CD30 era muito frequente em pacientes com mastocitose sistêmica agressiva e em leucemia de células mastocitárias. Eles também demonstraram franca e até mesmo ausência de expressão de CD30 em pacientes com mastocitose sistêmica indolente. Com estes achados, discutiram a possibilidade de que o CD30, em sendo detectado de maneira mais importante nos casos de mastocitose agressiva, poderia ser um marcador associado de pior prognóstico.

A detecção de CD30 em mastócitos neoplásicos em formas indolentes de mastocitose tem sido raramente descrita.⁸¹ E embora não haja um marcador imuno-histoquímico robusto que se correlacione com o prognóstico, uma possível relação entre a expressão de CD30 e uma evolução pejorativa da mastocitose foi descrita quase que exclusivamente em formas agressivas de MS.^{79,80} A referida expressão de CD30 em

mastócitos neoplásicos, como relatado anteriormente, nos levou a fazer uma pesquisa retrospectiva para a expressão de CD30 na mastocitose, para isso, testamos a imunomarcção de CD30 em uma série retrospectiva de pacientes com diagnóstico de mastocitose cutânea e mastocitose sistêmica.

Nossos resultados mostraram que a expressão de CD30 estava presente na maioria dos casos de mastocitose, independentemente de sua apresentação sistêmica e cutânea.

Entretanto, de uma maneira inesperada levando-se em consideração os relatos da literatura, os casos de mastocitose cutânea mostraram uma porcentagem maior de mastócitos positivos para o CD30 em comparação àqueles presentes na mastocitose sistêmica. Em efeito, dos 28 casos positivos para o CD30 na mastocitose cutânea, 11 apresentaram uma porcentagem de mastócitos neoplásicos CD30 positivos maior que 50% (39,2%); em relação aos casos de mastocitose sistêmica, apenas 3 casos do total de 11 casos positivos para o CD30 (27%) apresentaram mais de 50% dos mastócitos neoplásicos marcados para o CD30. Além disso, os mastócitos neoplásicos na mastocitose cutânea exibiram uma intensidade alta da imunomarcção para o CD30, com uma expressão intensa desse marcador em 14,2% dos casos (4/28) e moderada em 28,5% (8/28). Nos casos de mastocitose sistêmica, 1 caso teve expressão forte (1/11) e um caso teve expressão moderada (1/11) para o CD30; 9 casos de mastocitose sistêmica tiveram marcação fraca.

Os nossos achados se destacam principalmente em função de descrever as frequências e intensidades elevadas da imunomarcção da molécula CD30 nos casos de mastocitose cutânea. E também diferem dos relatados anteriores, nos quais prevaleceu a imunomarcção negativa ou infrequente de CD30 em casos de mastocitose indolente e mais frequente em mastocitose agressiva,^{79,81,82} além disso esses relatos não avaliaram a presença do CD30 na mastocitose cutânea.

Há raras descrições encontradas na literatura, limitando-se a relatos de casos, sobre a molécula CD30 e a mastocitose cutânea. Kulberg A e Mitteldorf C descreveram um caso de uma jovem paciente com antecedente de neoplasia de células germinativas do ovário um ano antes de ser diagnosticada uma mastocitose cutânea do subtipo urticária pigmentosa. Neste relato, a imunohistoquímica realizada em lesões da pele mostrou positividade para o CD30, CD4 e a pesquisa da mutação c-Kit N822K foi positiva. Como esta mutação é infrequente na mastocitose, em comparação à mutação D816V, os autores postularam que a referida mutação poderia também ser responsável pela aberrante expressão do CD30.⁸³

O significado da expressão tumoral de CD30 ainda é uma questão de debate. A expressão de CD30 pode estar associada a um fenótipo maligno ou refletir o recrutamento de

um meio inflamatório que aumenta o crescimento e a sobrevivência do tumor.⁶⁴ Também foi hipotetizado uma possível relação do ligante do CD30 (CD30L).⁷⁹ O ligante CD30 (CD30L/CD153) é detectado em uma variedade de tipos celulares, incluindo células T, granulócitos, monócitos/macrófagos, em uma proporção de precursores de células da medula óssea de várias linhagens e também expresso nas células de Hodgkin e Reed-Sternberg, sugerindo interação homotípica e possivelmente regulação de crescimento autócrino.⁴⁷ Tem sido demonstrado que mastócitos expressam o CD30L/CD153 e são predominantemente CD30L positivos no linfoma de Hodgkin.⁶⁶ Estes achados poderiam ser interpretados para uma possibilidade de interação de crescimento autócrino entre os mastócitos neoplásicos CD30 positivos e o seu ligante em mastócitos normais CD30L/CD153.⁷⁹

Pode-se argumentar que a positividade de CD30 em mastócitos pode ser o resultado da ativação destas células em fenômenos alérgicos e não estar relacionada à oncogênese destes mastócitos. Para responder a essa questão, testamos tanto as peles normais quanto as lesões de urticária, que, no entanto, eram CD30-negativas.

Especula-se que o CD30 pode estar envolvido em uma via de sinalização específica em mastócitos neoplásicos e poderia ser um potencial alvo terapêutico na mastocitose. De fato, estudos de fase I e II⁸⁴ demonstraram que o anticorpo monoclonal brentuximab vedotin produziu controle significativo de linfoma de Hodgkin, linfoma de células T periférico, linfoma cutâneo de células T e mesmo em casos de mastocitose sistêmica.⁶⁶ Esses achados ilustram que o CD30 é um alvo potencial para o tratamento da mastocitose.

6. CONCLUSÃO

Neste estudo, o CD30 mostrou-se freqüentemente positivo na mastocitose, independentemente de sua apresentação clínica. No entanto, encontramos uma porcentagem maior de mastócitos positivos e intensidade de coloração mais forte nos subtipos de MC. Esses achados sugerem que o CD30 é um marcador de mastócitos neoplásicos e não está presente exclusivamente em formas agressivas da doença, como relatado anteriormente.

7. REFERÊNCIAS

1. Horny HP, Akin C, Arber DA, et al. Mastocytosis. In: Swerdlow SH, Campos E, Harris NL, et al, eds. WHO Classification of Tumors of Haematopoietic and Lymphoide Tissues. Lyon: IARC Press; 2017:62-69.
2. Brockow K. Epidemiology, prognosis, and risk factors in mastocytosis. *Immunol Allergy Clin North Am.* 2014 May;34(2):283-95.
3. Valent P, Horny HP, Escribano L, et al. Diagnostic criteria and Classification of Mastocytosis: A consensus Proposal. *Leuk Res.* 2001;25:603-625.
4. Komi DEA, Rambasek T, Wöhrl S. Mastocytosis: from a Molecular Point of View. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2018 Jun;54(3):397-411.
5. Horny HP, Valent P. Diagnosis of mastocytosis: general histopathological aspects, morphological criteria, and immunohistochemical findings. *Leuk Res.* 2001;25:543-551.
6. Pardanani A, Baek JY, Li CY, Butterfield JH, Tefferi A. Systemic mast cell disease without associated hematologic disorder: a combined retrospective and prospective study. *Mayo Clin Proc.* 2002;77:1169-1175
7. Horny HP, Sillaber C, Menke D, et al. Diagnostic utility of staining for tryptase in patients with mastocytosis. *Am J Surg Pathol.* 1998;22:1132–1140.
8. Li C-Y. Diagnosis of mastocytosis: value of cytochemistry and immunohistochemistry. *Leuk Res* 2001;25: 537–541.
9. Horny HP, Sotlar K, Valent P. Mastocytosis: State of the Art. *Pathobiology* 2007;74:121-132.
10. Sotlar K, Horny HP, Simonitsch I, et al. CD25 indicates the neoplastic phenotype of mast cells: a novel immunohistochemical marker for the diagnosis of systemic mastocytosis (SM) in routinely processed bone marrow biopsy specimens. *Am J Surg Pathol.* 2004;28:1319–1325.
11. Jordan JH, Walchshofer S, Jurecka W, et al. Immunohistochemical properties of bone marrow mast cells in systemic mastocytosis: evidence for expression of CD2, CD117/Kit, and bcl-xL. *Hum Pathol.* 2001;32:545–552.
12. Nagata H, Worobec AS, Oh CK, et al. Identification of a point mutation in the catalytic domain of the protooncogene c-kit in peripheral blood mononuclear cells of patients who have mastocytosis with an associated hematologic disorder. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92: 10560–10564.

13. Feger F, Ribadeau Dumas A, Leriche L, Valent P, Arock M. Kit and c-kit mutations in mastocytosis: a short overview with special reference to novel molecular and diagnostic concepts. *Int Arch Allergy Immunol.* 2002;127:110-114.
14. Fritsche-Polanz R, Jordan JH, Feix A, et al. Mutation analysis of c-kit in patients with myelodysplastic syndromes without mastocytosis and cases of systemic mastocytosis. *Br J Haematol.* 2001;113:357-364.
15. Longley BJ Jr, Metcalfe DD, Tharp M, et al. Activating and dominant inactivating c-KIT catalytic domain mutations in distinct clinical forms of human mastocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96:1609-1614.
16. Longley BJ, Tyrrell L, Lu SZ, et al. Somatic c-KIT activating mutation in urticaria pigmentosa and aggressive mastocytosis: establishment of clonality in a human mast cell neoplasm. *Nat Genet.* 1996;12:312-314.
17. Yanagihori H, Oyama N, Nakamura K, Kaneko F. c-kit Mutations in patients with childhood-onset mastocytosis and genotype-phenotype correlation. *J Mol Diagn.* 2005;7:252-257.
18. Escribano L, Orfao A, Díaz-Agustin B, et al. Indolent systemic mast cell disease in adults: immunophenotypic characterization of bone marrow mast cells and its diagnostic implication. *Blood* 1998;91: 2731–2736.
19. Valent P, Akin C, Sperr WR, et al. Aggressive systemic mastocytosis and related mast cell disorders: current treatment options and proposed response criteria. *Leuk Res* 2003; 27: 635–641.
20. Hauswirth A, Sperr WR, Ghannadan M, et al. A case of smouldering mastocytosis with peripheral blood eosinophilia and lymphadenopathy. *Leuk Res* 2002;26:601–606.
21. Horny HP, Sotlar K, Sperr WR, Valent P. Systemic mastocytosis with associated clonal haematological non-mast cell lineage disease: a histopathological challenge. *J Clin Pathol.*2004;57:604–608.
22. Horny HP, Ruck M, Wehrmann M, Kaiserling E. Blood findings in generalized mastocytosis: evidence of frequent simultaneous occurrence of myeloproliferative disorders. *Br J Haematol.*1990;76:186–193.
23. Sperr WR, Horny HP, Lechner K, Valent P. Clinical and biologic diversity of leucemias occurring in patients with mastocytosis. *Leuk Lymphoma.*2000;37:473–486.
24. Tefferi A, Pardanani A. Clinical, genetic, and therapeutic insights into systemic mast cell disease. *Curr Opin Hematol.*2004;11:58–64.

25. Travis WD, Li CY, Hogaland HC, Travis LB, Banks PM. Mast cell leukemia: report of a case and review of the literature. *Mayo Clin Proc* 1986;61:957–966.
26. Valent P, Horny HP, Li CY, et al. Mastocytosis (mast cell disease). World Health Organization Classification of Tumours: Pathology and Genetics; in Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW (eds): *Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. Geneva, WHO, 2001, vol 1, pp 291–302.
27. Horny HP, Parwaresch MR, Kaiserling E, et al. Mast cell sarcoma of the larynx. *J Clin Pathol* 1986;39:596–602.
28. Kojima M, Nakamura S, Itoh H, et al. Mast cell sarcoma with tissue eosinophilia arising in the ascending colon. *Modern Pathology* 1999;12:739–743.
29. Guenther PP, Huebner A, Sobottka SB, et al. Temporary response of localized intracranial mast cell sarcoma to combination chemotherapy. *J Pediatr Hematol Oncol* 2001;23:134–138.
30. Akin C, Fumo G, Yavuz AS, Lipsky PE, Neckers L, Metcalfe DD. A novel form of mastocytosis associated with a transmembrane c-Kit mutation and response to imatinib. *Blood* 2004;103:3222–3225.
31. Akin C, Metcalfe DD. Occult bone marrow mastocytosis presenting as recurrent systemic anaphylaxis [abstract]. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111:S206.
32. Bernd HW, Sotlar K, Lorenzen J, et al. Acute myeloid leukaemia with t(8;21) associated with ‘occult’ mastocytosis. Report of an unusual case and review of the literature. *J Clin Pathol* 2004;57:324–328.
33. Valent P, Samorapoompichit P, Sperr WR, Horny HP, Lechner K. Myelomastocytic leukemia: myeloid neoplasm characterized by partial differentiation of mast cell-lineage cells. *Hematol J* 2002;3:90–94.
34. Sperr WR, Jordan JH, Baghestanian M, et al. Expression of mast cell tryptase by myeloblasts in a group of patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2001;98:2200–2209.
35. Horny HP, Sotlar K, Stellmacher F, et al. The tryptase-positive compact round cell infiltrate of the bone marrow (TROCI-bm): a novel histopathological finding requiring the application of lineage specific markers. *J Clin Pathol* 2006;59:98–302.
36. Georgin-Lavialle S, Barete S, Suarez F, et al. Current concepts and treatment advances in systemic mastocytosis. *Rev Med Interne*. 2009 Jan;30(1):25-34.

37. Delsol G, Ralfkiaer E, Stein H, et al. Anaplastic Large Cell Lymphoma. In: Jaffe ES, Harris NL, Stein H, et al, eds. Pathology and Genetics of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon: IARC Press; 2001:230-235.
38. Gatter K, Delsol G. The Diagnosis of Lymphoproliferative Diseases: An Atlas. In: Press, ed. New York: Oxford University; 2002:1-21.
39. Gatter KC, Warnke RA. Diffuse large B-cell lymphoma. In: Jaffe ES, Harris NL, Stein H, et al, eds. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon: IARC Press; 2001:171-174.
40. Piris M, Gatter KC, Mason DY. CD30 expression in follicular lymphoma. *Histopathology*. 1991;18:25-29.
41. Oflazoglu E, Grewal IS, Gerber H. Targeting CD30/C30L in Oncology and Autoimmune and Inflammatory Diseases. *Adv Exp Med Biol*. 2009;647:174-85.
42. Durkop H, Latza U, Hummel M, Eitelbach F, Seed B, Stein H. Molecular cloning and expression of a new member of the nerve growth factor receptor family that is characteristic for Hodgkin's disease. *Cell* 1992;68 (3):421-427.
43. Aizawa S, Satoh H, Horie R, et al. Cloning and characterization of a cDNA for rat CD30 homolog and chromosomal assignment of the genomic gene. *Gene* 1996;182 (1-2):155-162.
44. Gruss HJ, Duyster J, Herrmann F. Structural and biological features of the TNF receptor and TNF ligand superfamilies: interactive signals in the pathobiology of Hodgkin's disease. *Ann Oncol* 1996;7 Suppl 4:19-26.
45. Cabanillas F, Armitage J, Pugh WC, Weisenburger D, Duvic M. Lymphomatoid papulosis: a T-cell dyscrasia with a propensity to transform into malignant lymphoma. *Ann Intern Med* 1995;122(3):210-7
46. Croager EJ, Abraham LJ. Characterisation of the human CD30 ligand gene structure. *Biochim Biophys Acta* 1997;1353(3):231-5.
47. Gattei V, Degan M, Gloghini A, et al. CD30 ligand is frequently expressed in human hematopoietic malignancies of myeloid and lymphoid origin. *Blood* 1997;89(6):2048-59;
48. Younes A, Consoli U, Zhao S, et al. CD30 ligand is expressed on resting normal and malignant human B-lymphocytes. *Br J Haematol* 1996;93(3):569-71.
49. Molin D, Fischer M, Xiang Z, et al. Mast cells express functional CD30 ligand and are the predominant CD30L-positive cells in Hodgkin's disease. *Br J Haematol* 2001;114(3):616-23.

50. Duckett CS, Thompson CB. CD30-dependent degradation of TRAF2: implications for negative regulation of TRAF signaling and the control of cell survival. *Genes Dev* 1997;11(21):2810-21.
51. Aizawa S, Nakano H, Ishida T, et al. Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 5 and TRAF2 are involved in CD30-mediated NFkappaB activation. *J Biol Chem* 1997;272(4):2042-5.
52. Duckett CS, Gedrich RW, Gilfillan MC, Thompson CB. Induction of nuclear factor kappaB by the CD30 receptor is mediated by TRAF1 and TRAF2. *Mol Cell Biol* 1997;17(3):1535-42.
53. Horie R, Aizawa S, Nagai M, et al. A novel domain in the CD30 cytoplasmic tail mediates NFkappaB activation. *Int Immunol* 1998;10(2):203-10.
54. Pires BRB, Silva RCMC, Ferreira GM, Abdelhay E. NF-kappaB: Two Sides of the Same Coin. *Genes (Basel)*. 2018Jan 9;9(1). pii:E24
55. Hoesel B, Schmid JA. The complexity of NF-κB signaling in inflammation and cancer. *Mol. Mol Cancer*. 2013 Aug2;12:86.
56. Gilmore TD, Garbati MR. Inhibition of NF-Kb signaling as a strategy in disease therapy. *Curr. Top. Microbiol*. 2011;349,245–263.
57. Gupta SC, Sundaram C, Reuter S, Aggarwal BB. Inhibiting NF-κB activation by small molecules as a therapeutic strategy. *Biochim. Biophys. Acta* 2010;1799, 775–787.
58. GuzmanML, NeeringSJ, UpchurchD, et al. Nuclear factor-κB is constitutively activated in primitive human acute myelogenous leukemia cells. *Blood* 2001;98,2301–2307.
59. Bargou R, Leng C, Krappmann D, et al. High-level nuclear NF-kappa Band Oct-2 is a common feature of cultured hodgkin/reed-sternberg cells. *Blood*.1996;87,4340–4347.
60. Mir SS, Richter BW, Duckett CS. Differential effects of CD30 activation in anaplastic large cell lymphoma and Hodgkin disease cells. *Blood* 2000;96(13):4307-12)
61. Gruss HJ, Boiani N, Williams DE, Armitage RJ, Smith CA, Goodwin RG. Pleiotropic effects of the CD30 ligand on CD30-expressing cells and lymphoma cell lines. *Blood* 1994;83(8):2045-56.
62. Falini B, Pileri S, Pizzolo G, et al. CD30 (ki-1) molecule: a new cytokine receptor of the tumor necrosis factor receptor superfamily as a tool for diagnosis and immunotherapy. *Blood* 1995;85(1):1–14).
63. Tamiolakis D, Maroulis G, Simopoulos C, et al. Human embryonal tissues of all three germ layers can express the CD30 antigen. An immunohistochemical study of 30

- fetuses coming after therapeutic abortions from week 8th to week 16th of gestation. *Cesk Patol* 2006;42(1):9–15.
64. Sotlar K, Cerny-Reiterer S, Petat-Dutter K, et al. Aberrant expression of CD30 in neoplastic mast cells in high-grade mastocytosis. *Mod Pathol*. 2011;24(4):585-595.
 65. Claro RA, McGinn K, Kwitkowski V, et al. U.S. food and drug administration approval summary: brentuximab vedotin for the treatment of relapsed Hodgkin lymphoma or relapsed systemic anaplastic large-cell lymphoma. *Clin Cancer Res* 2012;18(21):5845–9.
 66. Blatt K, Cerny-Reiterer S, Schwaab J, et al. Identification of the Ki-1 antigen (CD30) as a novel therapeutic target in systemic mastocytosis. *Blood* 2015;126(26):2832-2841.
 67. Borate U, Mehta A, Reddy V, Tsai M, Josephson N, Schnadig I. Treatment of CD30-positive systemic mastocytosis with brentuximab vedotin. *Leukemia Research* 2016;44:25-31.
 68. Morgado JM, Perbellini O, Johnson RC, et al. CD30 expression by bone marrow mast cells from different diagnostic variants of systemic mastocytosis. *Histopathology*. 2013;63(6): 780-787.
 69. Maric I, Calvo KR. Mastocytosis: the new differential diagnosis of CD30-positive neoplasms. *Leuk Lymphoma* 2011;52:732–3.
 70. Lim KH, Tefferi A, Lasho TL, et al. Systemic mastocytosis in 342 consecutive adults: survival studies and prognostic factors. *Blood* 2009;113:5727–36.
 71. Uzzaman A, Maric I, Noel P, Kettelhut BV, Metcalfe DD, Carter MC. Pediatric-onset mastocytosis: a long term clinical follow-up and correlation with bone marrow histopathology. *Pediatr Blood Cancer* 2009;53:629–34.
 72. Brockow K. Epidemiology, prognosis, and risk factors in mastocytosis. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2014 May;34(2):283-95.
 73. Brockow K, Metcalfe D. Mastocytosis. In: Rich R, Fleischer T, Shearer W, et al, editors. *Clinical immunology*. Vol. 1. 2nd edition. London: Mosby International Ltd; 2001. p. 55.1–9.
 74. Escribano L, Alvarez-Twose I, Sanchez-Munoz L, et al. Prognosis in adult indolent systemic mastocytosis: a long-term study of the Spanish Network on Mastocytosis in a series of 145 patients. *J Allergy Clin Immunol* 2009;124:514–21.
 75. Stein H, Mason DY, Gerdes J, et al. The expression of the Hodgkin's disease associated antigen Ki-1 in reactive and neoplastic lymphoid tissue: evidence that

- Reed-Sternberg cells and histiocytic malignancies are derived from activated lymphoid cells. *Blood*. 1985;66(4): 848-858.
76. Chiarle R, Podda A, Prolla G, Gong J, Thorbecke GJ, Inghirami G. CD30 in normal and neoplastic cells. *Clin Immunol*. 1999;90(2):157-164.
77. Segal GH, Kjeldsberg CR, Smith GP, Perkins SL. CD30 antigen expression in florid immunoblastic proliferations. A clinicopathologic study of 14 cases. *Am J Clin Pathol* 1994;102:292–298.
78. Bengtsson A, Johansson C, Linder MT, Halldén G, van der Ploeg I, Scheynius A. Not only Th2 cells but also Th1 and Th0 cells express CD30 after activation. *J Leukoc Biol* 1995;58:683–689..
79. Sotlar K, Cerny-Reiterer S, Petat-Dutter K, et al. Aberrant expression of CD30 in neoplastic mast cells in high-grade mastocytosis. *Mod Pathol*.2011;24(4):585-595.
80. Valent P, Sotlar K, Horny HP. Aberrant expression of CD30 in aggressive systemic mastocytosis and mast cell leukemia: a differential diagnosis to consider in aggressive hematopoietic CD30-positive neoplasms. *Leuk Lymphoma*. 2011;52(5):740-744.
81. Moonim MT, Kossier T, van DerWalt J, Wilkins B, Harrison CN, Radia DH. CD30/CD123 expression in systemic mastocytosis does not correlate with aggressive disease. *Blood* 2012;120:1746.
82. Chiu A, Orazi A. Mastocytosis and related disorders. *Semin Diagn Pathol* 2012;29:19–30.
83. Kulberg A, Mitteldorf C. CD4 and CD30 Coexpression in a Cutaneous Manifestation of Systemic Mastocytosis-A Pitfall. *Am J Dermatopathol*. 2018 Aug;40(8):628-630.
84. van der Weyden CA, Pileri SA, Feldman AL, Whisstock J, Prince HM. Understanding CD30 biology and therapeutic targeting: a historical perspective providing insight into future directions. *Blood Cancer J* 2017;7:603.

8. ANEXOS

Anexo 1: Critérios/achados para as variantes de mastocitose sistêmica:

ACHADOS B

- Grande quantidade de mastócitos (medula óssea): >30% de infiltração celular por mastócitos e triptase sérica total > 200ng/ml
- Sinais de displasia ou mieloproliferação em linhagem não mastocitária
- Hepatomegalia com ou sem disfunção hepática; esplenomegalia sem hiperesplenismo e /ou linfadenopatia

ACHADOS C

- Disfunção da medula óssea causada por infiltração de mastócitos neoplásicos
- Disfunção hepática e hepatomegalia
- Envolvimento esquelético
- Esplenomegalia com hiperesplenismo
- Malabsorção e perda de peso devido à infiltrado gastrointestinal

Anexo 2: Dispensa de apresentação de projeto de pesquisa para avaliação do sistema CEP-CONEP.



Cidade Universitária "Zeferino Vaz", 23 de outubro de 2018.

Of. CEP/PRP/Nº 205/2018

Geisilene Russano de Paiva Silva
Pesquisadora Responsável

REF. : DISPENSA DE APRESENTAÇÃO DE PROJETO DE PESQUISA PARA AVALIAÇÃO DO SISTEMA CEP-CONEP.

Prezada Senhora,

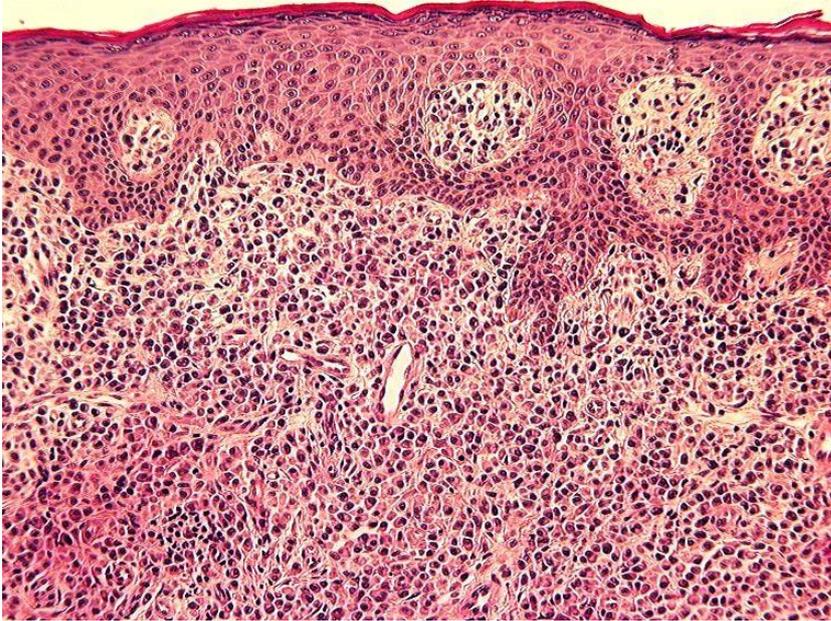
Informamos que o projeto de pesquisa "PESQUISA DA EXPRESSÃO DA MOLÉCULA CD30/Kii EM MASTOCITOSE CUTÂNEA E SISTÊMICA", sob a orientação do Prof. Dr. José Vassallo, trata-se de um estudo retrospectivo com casos de mastocitoses cutânea e sistêmica de 2000 à 2006 do Centro Hospitalar Universitário de Toulouse – França. Os casos foram pareados e grupos comparativos foram utilizados, como peles normais e urticárias.

Deste modo, o referido projeto de pesquisa não necessita tramitar pelo Comitê de Ética em Pesquisas envolvendo Seres Humanos, tendo em vista que não envolve participantes do território nacional, conforme descrito na Resolução CNS 466/12, item VII, "...num trabalho cooperativo que visa, especialmente, à proteção dos participantes de pesquisa do Brasil..."..

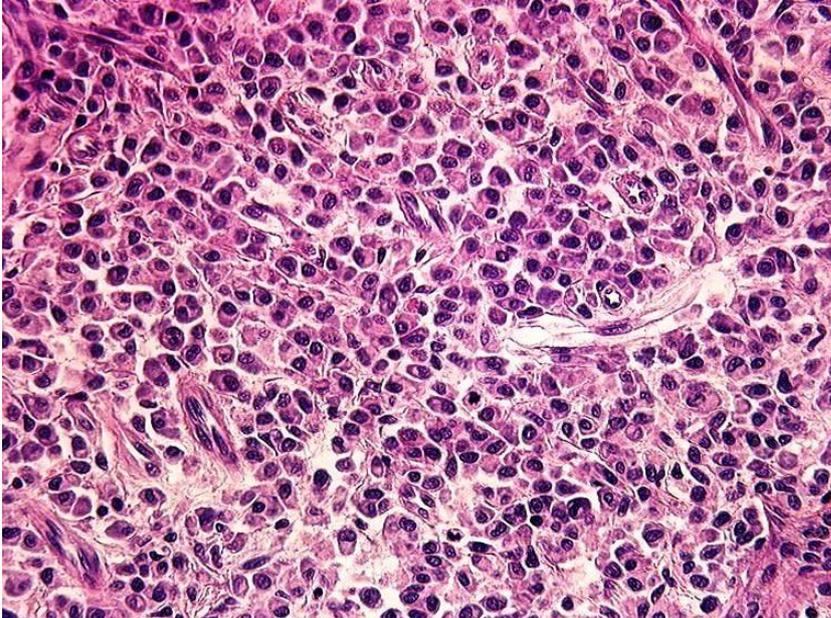
Atenciosamente,


Dra. Renata Maria dos Santos Celeghini
COORDENADORA DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
UNICAMP

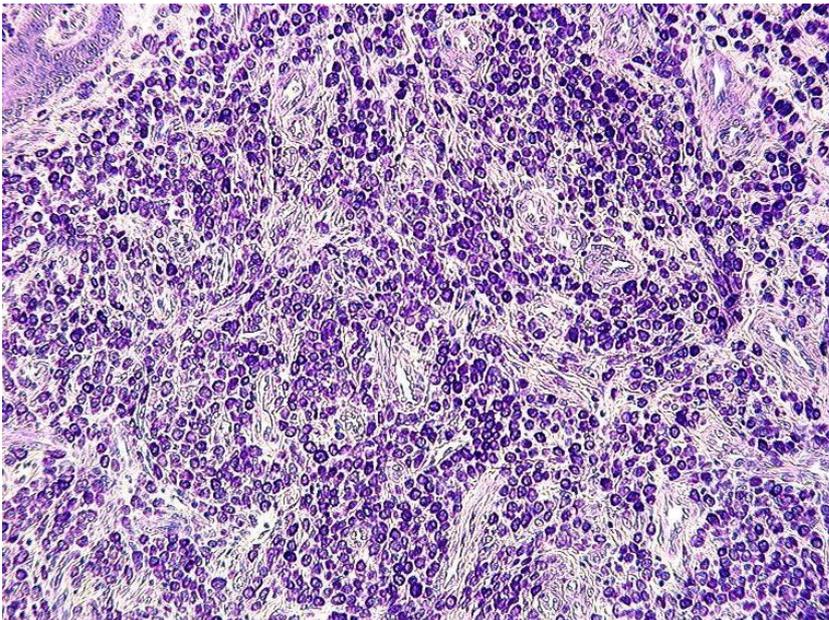
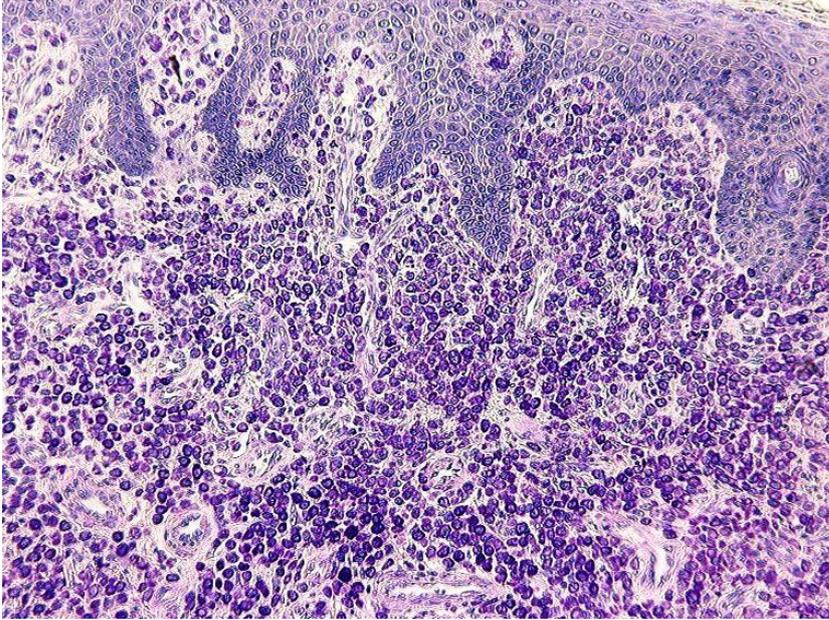
Anexo 3: Inclusão de imagens conforme solicitação de banca examinadora.



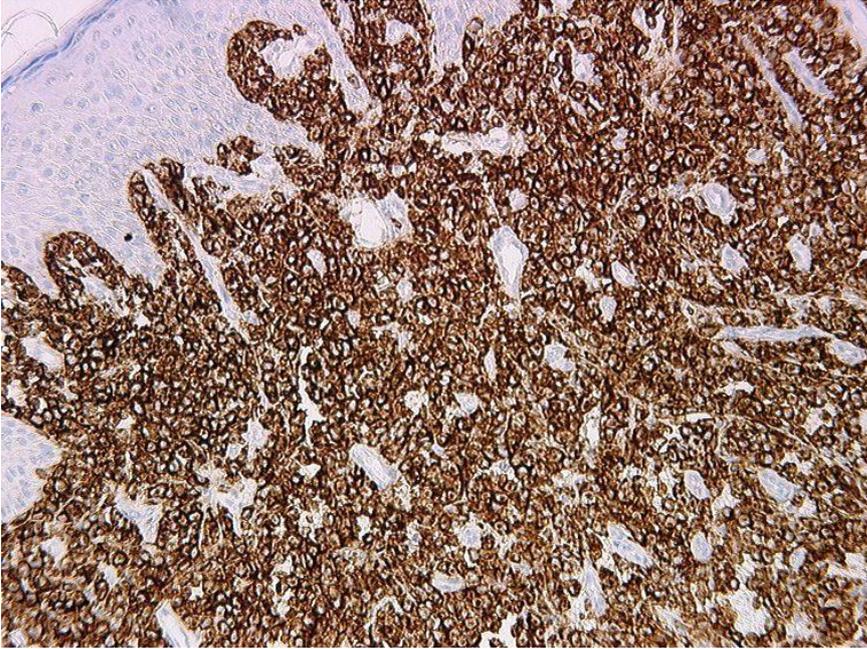
A coloração de rotina evidencia na superfície, a epiderme íntegra e no derme um denso infiltrado neoplásico (H&E 100X)



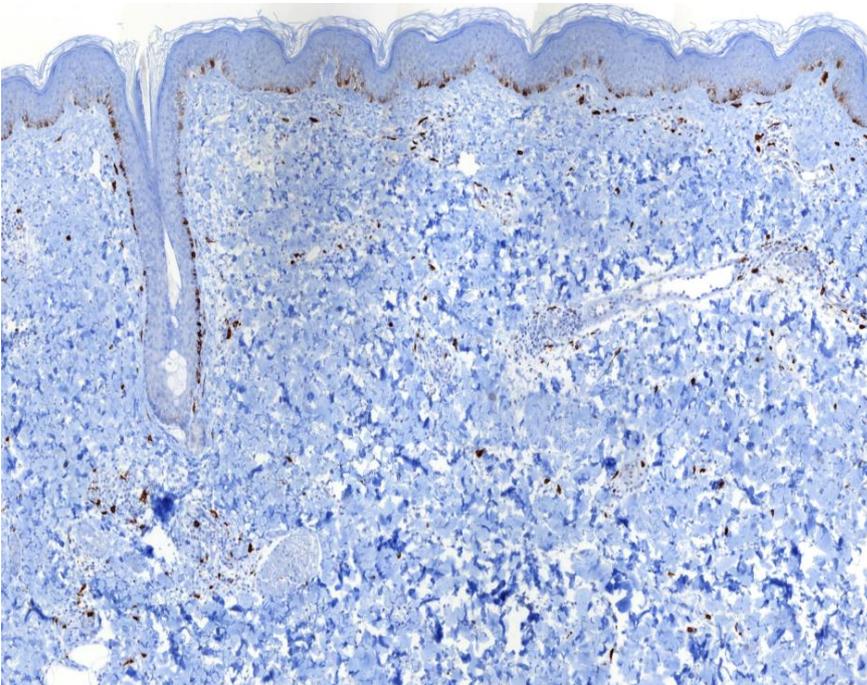
A coloração de rotina evidencia no maior aumento células com amplo citoplasma eosinofílico com núcleos aumentados de volume, hipercromáticos e excêntricos dando um aspecto “plasmocitóide” (H&E 400X)



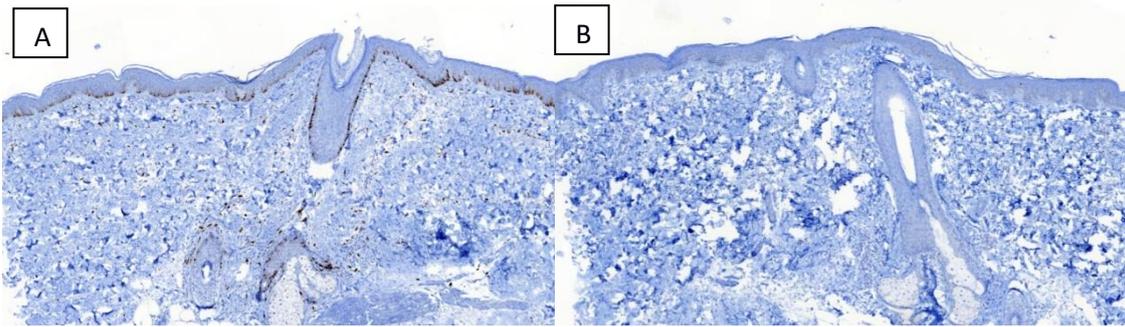
A coloração especial do azul de Toluidina nas duas imagens mostra a coloração metacromática com tom arroxeadado do citoplasma dos mastócitos. Isso devido à associação à heparina presente nos grânulos citoplasmáticos dos mastócitos (100X)



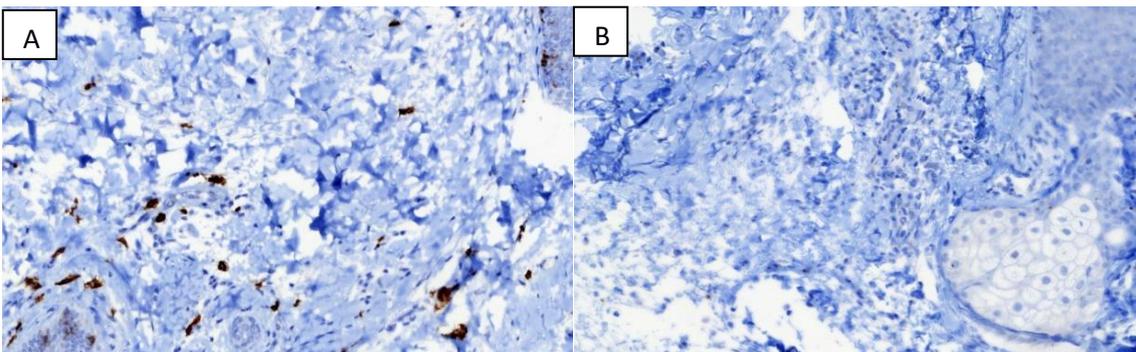
Na superfície observa-se a epiderme íntegra e no derme, evidencia-se uma intensa positividade das células mastocitárias para o CD117 (200X)



A marcação para o CD117 em caso de urticaria mostra o controle interno da reação positivo (melanócitos positivos na epiderme) e no derme positividade em raros mastócitos reacionais (100X)



A- A imunomarcção para o CD117 evidencia na pele com urticária os melanócitos na epiderme (controle interno positivo) e no derme a presença de raros mastócitos perianexiais. (100X) B- A imunomarcção para o CD30 não evidencia nenhuma célula positiva (100X)



A- No maior aumento, a marcação para o CD117 em caso de urticaria mostra no derme positividade em raros mastócitos reacionais (400X). B- A imunomarcção para o CD30 não evidencia nenhuma célula positiva (400X).