

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS: PEDIATRIA

**MASTOCITOSE NA INFÂNCIA: ESTUDO ANATOMO-
PATOLÓGICO E IMUNO-HISTOQUÍMICO**

EVÓDIE INÊS FERNANDES

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Porto Alegre, Brasil

2002

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS: PEDIATRIA

MASTOCITOSE NA INFÂNCIA: ESTUDO ANATOMO-PATOLÓGICO E IMUNO-HISTOQUÍMICO

EVÓDIE INÊS FERNANDES

Orientadora: Profa. Dra. Tania Ferreira Cestari

A apresentação desta dissertação de mestrado é exigência do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Pediatria, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para obtenção do título de Mestre.

Porto Alegre, Brasil
2002

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à todas as crianças com mastocitose e, em especial, à quatro pessoas maravilhosas: aos meus pais, Beno e Maria Inês, por terem me orientado na vida, ensinando-me os princípios a serem seguidos, e que a dedicação e a persistência são fundamentais para se alcançar o que se deseja; ao Fernando, meu marido, pelo seu amor, carinho, compreensão e incentivo demonstrados ao longo da nossa vida em comum e, especialmente, no decorrer desta jornada; e à Dra. Tania, minha mestra e iluminadora, pelo seu irrestrito empenho e dedicação na orientação deste estudo.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Tania Ferreira Cestari, orientadora deste estudo, pelo seu infinito incentivo e apoio técnico e emocional. Exemplo de dedicação ao ensino e à pesquisa e de incansável esforço para a formação e qualificação de dermatologistas. Seu brilhantismo pessoal e profissional engrandece a todos que tem a oportunidade da sua convivência e envaidece a Dermatologia.

Ao Dr. Luís Fernando Rivero, patologista, profissional reconhecido pela sua dedicação à Imuno-histoquímica do Serviço de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pela sua colaboração imprescindível tanto para o desenvolvimento e aplicação da técnica imuno-histoquímica quanto a análise histológica realizadas nesta pesquisa. Agradeço pela atenção e empenho dedicados e reparto os méritos que, porventura, advirão.

Ao Dr. Vinícius Duval da Silva, brilhante citologista, que contribui com conhecimento e inovação na sua área de atuação, através da implantação de métodos até então muito distantes da nossa realidade de trabalho. Agradeço pelas oportunidades, tanto de aprendizado quanto de aplicação da análise de imagem.

À Dda. Beatriz Castellar de Faria Wartignago, acadêmica do último ano da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e futura dermatologista. Agradeço com toda a sinceridade pela dedicação, empenho, colaboração e

competência com que participou deste estudo, sempre trazendo contribuições a mais do que o solicitado. Desta convivência nasceu um profundo respeito e uma bela amizade.

Ao Dr. Lúcio Bakos, chefe do Serviço de Dermatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, professor aplicado ao desenvolvimento do ensino e da pesquisa na dermatologia, por possibilitar esta pesquisa no Serviço.

Ao Dr Antônio Carlos Pütten, chefe do Serviço de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pelo seu inestimável apoio e por possibilitar a execução desta pesquisa no Serviço.

Ao Dr. Roberto Lopes Gervini, chefe do Serviço de Dermatologia do Hospital Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, pelo interesse e motivação pelo estudo, facilitando o acesso aos casos.

Ao Dr. Jorge David Zanol, conceituado dermatopatologista, pela sua receptividade e imprescindível colaboração nesta pesquisa. Agradeço pela sua disposição, e também a de todos os seus funcionários, o que possibilitou a identificação de vários casos.

A Dra. Vania Naomi Hirakata, bioestatística do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pelo seu interesse e dedicação na orientação e execução da análise e compreensão dos resultados da pesquisa.

Ao Prof. Beno Fernandes, prestigiado professor e apaixonado pela Língua Portuguesa, pelo trabalho carinhosamente prestado de revisão e correção desta dissertação.

À Sra. Flávia Rejane Giusti, técnica responsável pela execução dos exames de imuno-histoquímica do Serviço de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pela sua inestimável colaboração com a pesquisa, disposição e competência na execução de suas atividades.

Ao Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pelo estímulo constante e apoio técnico, facilitando a execução dos projetos de pesquisa. Agradeço também o apoio financeiro recebido através do Fundo de Incentivo à Pesquisa, que tornou viável a execução desta pesquisa.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Pediatria, pela sua dedicação ao ensino e pesquisa na formação de novos mestres e doutores, e responsáveis pelo prestígio do Curso.

Aos colegas dermatologistas que facilitaram e colaboraram com o acesso aos casos provenientes de sua clínica privada: Dr. Cácio César Pierezan, Dr. Cláudio Bartelle, Dr. Domingos Martins Costa, Dr. Gérson Caselli, Dr. Gérson Trevilatto, Dra. Gilvana Bonella, Dra. Irene Medina, Dra. Isabel Cristina Palma Kuhl, Dr. James Motta, Dr. José Grossi Neto, Dra. Lena Maris Fernandez, Dr. Levonir Schweig, Dra. Magda Blessmann Weber, Dra. Maria Eloísa Campos, Dra. Marilene Donato, Dra. Marlene Laks Weissbluth, Dra. Moira Festugato, Dr. Nelson Ricachnewsky, Dra. Olga Barrios, Dra. Rosane Schwartz, Dr. Sérgio Dornelles, Dra. Simone Pessato, Dra. Tania Ferreira Cestari e Dr. Walmor Bonato.

Aos Professores e Preceptores do Serviço de Dermatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Dr. Lúcio Bakos, Dr. Luiz Fernando Bopp Müller, Dra. Ane Maria Simões Pires, Dra. Isabel Cristina Palma Kuhl, Dra. Márcia Salete Zampese, Dra. Marlene Laks Weissbluth e Dra. Miriam Pargendler Peres, que facilitaram e colaboraram com o acesso aos casos provenientes deste Serviço.

Ao Dr. André Cartell, dermatopatologista do Serviço de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Aos funcionários da Zona 13 e da Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre que de um modo ou de outro colaboraram ou facilitaram a realização deste projeto.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	X
LISTA DE FIGURAS	XII
LISTA DE TABELAS	XIV
RESUMO	XV
SUMMARY	XIX
1 REVISÃO DA LITERATURA	1
1.1 Definição	1
1.2 Classificação	1
1.3 Etiologia e Patogênese	3
1.4 Epidemiologia	10
1.5 Mastocitose Familiar	10
1.6 História	11
1.7 Manifestações Cutâneas da Mastocitose	11
1.8 Manifestações Sistêmicas da Mastocitose	17
1.9 Diagnóstico	19
1.10 Diagnóstico Diferencial	20

1.11 Tratamento	21
1.12 Prognóstico	22
2 JUSTIFICATIVA	23
3 OBJETIVOS.....	25
3.1 Objetivo Geral	25
3.2 Objetivos Específicos.....	25
4 MATERIAL E MÉTODO.....	27
4.1 Delineamento da Pesquisa.....	27
4.2 População e Amostra	27
4.3 Processo de Amostragem.....	28
4.3.1 Cálculo do Tamanho da Amostra.....	28
4.3.2 Critérios de Inclusão.....	28
4.3.3 Critérios de Exclusão.....	28
4.4 Variáveis em Estudo.....	29
4.5 Locais de Realização.....	29
4.6 Considerações Éticas.....	30
4.6.1 Consentimento Informado.....	30
4.6.2 Termo de Compromisso para Utilização de Dados	30
4.7 Logística.....	31
4.7.1 Identificação dos Casos.....	31
4.7.2 Análise dos Cortes em Parafina.....	32
4.7.3 Técnica de Imuno-histoquímica.....	33
4.7.4 Análise de Imagem	35

4.8 Análise dos Resultados	38
5 RESULTADOS	39
5.1 Características da População.....	39
5.2 Análise Histológica.....	41
5.3 Análise Imuno-histoquímica.....	45
6 DISCUSSÃO	51
6.1 Características da População.....	51
6.2 Análise Histológica.....	56
6.3 Análise Imuno-histoquímica.....	58
7 CONCLUSÕES	66
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
ANEXOS	77

LISTA DE ABREVIATURAS

AP	anátomo-patológico
DAB	3-3'-tetracloreto de diaminobenzidina
DP	desvio padrão
EUA	Estados Unidos da América
GPPG	Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
HE	hematoxilina-eosina
IH	imuno-histoquímica
Ln	logaritmo natural
MB	mastocitose bolhosa
MCD	mastocitose cutânea difusa
MC ^T	mastócitos triptase
MC ^{TC}	mastócitos triptase quimase
MO	medula óssea
NA	não aplicável
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> - tampão de fosfato
SAMIS	Serviço de Arquivo Médico e Informações em Saúde do Hospital de Clínicas

de Porto Alegre

SCF	<i>stem cell factor</i> – fator de crescimento de mastócitos
SD	<i>standard deviation</i> – desvio-padrão
SUS	Sistema Único de Saúde
TNF- α	<i>tumor necrosis factor alpha</i> – fator de necrose tumoral alfa
UP	urticária pigmentosa
UVB	ultravioleta B

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Mastocitoma solitário.	12
Figura 2	Urticária pigmentosa.	14
Figura 3	Urticária pigmentosa.	14
Figura 4	Urticária pigmentosa com sinal de Darier.	14
Figura 5	Mastocitose bolhosa.	16
Figura 6	Mastocitose bolhosa.	16
Figura 7	Análise de imagem mostrando a área de contagem e os mastócitos enumerados.	37
Figura 8	Análise de imagem mostrando a identificação de 5 mastócitos na área assinalada.	37
Figura 9	Infiltrado perivascular de mastócitos, marcados com anticorpo antitriptase (imuno-histoquímica estreptavidina-peroxidase), 400X. ...	43
Figura 10	Infiltrado nodular de mastócitos na derme papilar e reticular, coloração por HE, 100X.	43
Figura 11	Mesmo caso da figura 10, com infiltrado nodular de mastócitos, marcados com anticorpo antitriptase (imuno-histoquímica	

	estreptavidina-peroxidase), 400X.	43
Figura 12	Infiltrado perineural e perivascular de mastócitos, HE, 400X.	44
Figura 13	Infiltrado perineural de mastócitos marcados com anticorpo antitriptase (imuno-histoquímica estreptavidina-peroxidase), 400X. ...	44
Figura 14	Eosinófilos na região perivascular, HE, 400X.	44
Figura 15	Diferenças entre as densidades de mastócitos entre dois métodos (imuno-histoquímica – histologia) contra a média dos dois métodos [(imunohistoquímica + histologia)/2].	49
Figura 16	Regressão linear entre os dois métodos (imuno-histoquímica e histologia) após transformação logarítmica das densidades de mastócitos.	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Classificação Revisada do Consenso, 1991	2
Tabela 2	Características morfológicas e localizações das subpopulações de mastócitos	6
Tabela 3	Relação dos mediadores pré-formados e gerados nos mastócitos	9
Tabela 4	Principais degranuladores de mastócitos	19
Tabela 5	Características demográficas e clínicas dos 33 pacientes com mastocitose	39
Tabela 6	Descrição das principais características dos 6 casos de mastocitose sistêmica da amostra	40
Tabela 7	Localização e freqüência das lesões cutâneas dos 33 casos de mastocitose com idade entre 3 meses e 14 anos	41
Tabela 8	Descrição dos valores individuais e estatísticas descritivas das densidade de mastócitos nas análises histológica e imuno-histoquímica em biópsias da pele de pacientes de 3 meses a 14 anos com diferentes formas de mastocitose cutânea	47

RESUMO

Introdução

A mastocitose abrange um grupo heterogêneo de condições crônicas caracterizado pela proliferação excessiva de mastócitos nos tecidos. Os sinais e sintomas clínicos são decorrentes da distribuição anatômica dos mastócitos e do efeito funcional dos mediadores produzidos e liberados por estas células. Na infância, a doença é considerada uma condição benigna na maioria dos casos, cujo comprometimento característico é o cutâneo. As mais freqüentes manifestações na pele são os mastocitomas e a urticária pigmentosa. Lesões cutâneas bolhosas podem manifestar-se e acompanhar todas as formas de mastocitose e quando esta apresentação é a predominante, é denominada de mastocitose bolhosa.

O diagnóstico de mastocitose é suspeitado clinicamente e confirmado pela histologia. A demonstração do aumento do número de mastócitos nas lesões cutâneas características se constitui no principal critério diagnóstico. Contudo, este método tem dificuldades técnicas que impedem a adequada reprodutibilidade dos achados, dificultando a elucidação de casos duvidosos e retardando seu tratamento.

Considerando as propriedades imunológicas e a importância clínica dos mastócitos reveste-se de maior importância compreender o papel destas células nas doenças, sendo indispensável identificá-las e enumerá-las com acurácia nos tecidos.

Objetivos

Quantificar o número de mastócitos marcados com anticorpo monoclonal antitriptase, através de técnica imuno-histoquímica e análise de imagem, em biópsias cutâneas de crianças, com diagnóstico clínico de mastocitose.

Descrever os achados histológicos; quantificar o número de mastócitos marcados com o anticorpo antitriptase entre as diferentes expressões clínicas da mastocitose cutânea; comparar o número de mastócitos entre os casos de mastocitose cutânea e mastocitose associada à sintomas sistêmicos e correlacionar as contagens de mastócitos entre os dois diferentes métodos (coloração por Giemsa com contagem manual e marcação com anticorpo antitriptase e análise digital).

Material e Método

Foram incluídas no estudo biópsias cutâneas de crianças de 0 a 14 anos, com diagnóstico clínico e histológico de mastocitose. Os casos foram classificados de acordo com a apresentação clínica cutânea em mastocitoma, urticária pigmentosa ou mastocitose bolhosa e assinalada a presença de sintomas sistêmicos associados.

Os fragmentos de pele fixados em formalina e emblocados em parafina foram cortados e utilizados para diagnóstico histopatológico convencional, corados com hematoxilina-eosina e Giemsa, e para análise imuno-histoquímica com estreptavidina peroxidase marcados com anticorpo antitriptase. A densidade de mastócitos (número de células por área) foi realizada por um único observador na técnica histológica e através de um sistema de análise de imagem de vídeo no método imuno-histoquímico.

Resultados

Foram avaliados 33 casos de mastocitose, sendo 21 do sexo masculino. Dez casos (30,3%) apresentavam mastocitoma, 21 (63,6%) urticária pigmentosa e 2 (6,1%)

mastocitose bolhosa. Todos os casos da amostra foram classificados como tendo mastocitose incipiente e em 6 (18,8%) pacientes pôde ser identificada a associação com sintomas sistêmicos. Prurido foi o sintoma mais freqüente, sendo relatado em 21 casos.

Em 21 dos 33 casos foi identificada a infiltração de mastócitos na derme havendo predominância pela região perivascular ($p=0,001$, teste exato de Fisher). Não houve diferenças significativas entre a presença de infiltrado mastocitário e as várias formas cutâneas de mastocitose ou a mastocitose sistêmica. A presença de eosinófilos foi identificada em 15 casos (45,5%) e em 10 casos associadamente ao infiltrado perivascular de mastócitos.

A densidade de mastócitos na técnica histológica, incluindo-se todos os casos, foi 50,00 células/mm². Não houve diferença significativa das contagens entre os pacientes com mastocitoma e aqueles com urticária pigmentosa, assim como entre os pacientes com e sem sintomas sistêmicos associados aos cutâneos.

A densidade de mastócitos encontrada com a técnica imuno-histoquímica e contagem por análise de imagem foi 158,85 células/mm². Não houve diferença significativa das contagens entre os pacientes com mastocitoma e aqueles com urticária pigmentosa, assim como entre aqueles com e sem sintomas sistêmicos.

Comparando-se a contagem dos mastócitos por área (densidade) entre a histologia e a imuno-histoquímica houve uma diferença significativa ($p=0,0001$ teste não-paramétrico de Wilcoxon). A média da diferença entre as contagens foi 199,98 células/mm² ($\pm 365,31$ DP). Também não houve semelhança, entre os dois métodos, nos grupos mastocitoma e urticária pigmentosa ($p=0,005$ e $p=0,01$, respectivamente, teste não-paramétrico de

Wilcoxon). Puderam ser identificados 518% a mais de mastócitos com a técnica imuno-histoquímica quando comparada com a histológica.

Conclusões

O presente estudo permite concluir que: 1) a localização preferencial da infiltração de mastócitos é dérmica e perivascular, não sendo possível identificar diferenças histológicas entre casos de urticária pigmentosa e mastocitoma; 2) o número de mastócitos marcados com o anticorpo monoclonal antitriptase e contados com análise digital de imagem, em biópsia de pele de crianças com diagnóstico clínico de mastocitose, foi 159 células por milímetro quadrado; 3) a densidade de mastócitos, foi semelhante entre os casos de urticária pigmentosa e mastocitoma e entre os casos com e sem sintomas sistêmicos associados nas duas diferentes técnicas empregadas; 4) o número de mastócitos por milímetro quadrado com a técnica imuno-histoquímica e a contagem através de análise de imagem foi significativamente maior quando comparada com a coloração através de Giemsa e a contagem manual, com uma diferença média entre os dois métodos de 200 células por milímetro quadrado; 5) a densidade de mastócitos com a técnica imuno-histoquímica foi significativamente maior tanto nos casos com urticária pigmentosa quanto nos com mastocitoma, quando comparada com a técnica empregada rotineiramente e 6) com a técnica imuno-histoquímica e a contagem através de análise de imagem foi possível identificar 518% a mais de mastócitos quando comparada com a técnica histológica.

SUMMARY

Introduction

Mastocytosis includes a heterogeneous group of chronic conditions characterized by increased proliferation of mast cells in the tissues. The clinical signs and symptoms result from the anatomic distribution of mast cells and from the functional effect of mediators produced and discharged by these cells. In childhood, the disease is considered a benign condition, in the majority of the cases, whose characteristic implication is cutaneous. The most frequent manifestations in the skin are mastocytomas and urticaria pigmentosa. Bullous cutaneous lesions may be manifested and accompany all kinds of mastocytosis and when this presentation is predominant, it is named bullous mastocytosis.

The diagnosis of mastocytosis is clinically suspected and confirmed by histology. The demonstration of increased number of mast cells in proper cutaneous lesions is the main diagnostic criterion. Although, this method has technical problems that impede the adequate reproduction of the findings, complicating the elucidation of doubtful cases and delaying the treatment.

Considering the immunological properties and the clinical significance of mast cells becomes of great relevance to understand the role of these cells in the diseases, being absolutely necessary to identify and enumerate them with accuracy in the tissues.

Aims

To count the number of marked mast cells with anti-tryptase monoclonal antibody, by immunohistochemical technique and image analysis in cutaneous biopsies of children with clinical diagnosis of mastocytosis.

To describe the histological findings; to count the number of marked mast cells with anti-tryptase antibody among the different clinical expressions of cutaneous mastocytosis; to compare the number of mast cells among the cases of cutaneous mastocytosis and systemic mastocytosis and to correlate the counting of mast cells between both different methods (stained by Giemsa with handy counting and marked with anti-tryptase antibody and digital analysis).

Material and Methods

Cutaneous biopsies of children from 0 to 14 years old were included in the study, with clinical and histological diagnosis of mastocytosis. The cases were classified according to the clinical presentation in mastocytoma, urticaria pigmentosa or bullous mastocytosis and distinguished the presence of associated systemic symptoms.

The blocks of formalin fixed and paraffin embedded fragments of skin were cut and utilized for conventional histopathologic diagnosis, stained with hematoxylin eosin and Giemsa. Similar sections were processed for immunohistochemical analysis with streptavidin peroxidase marked with anti-tryptase antibody. The evaluation of the density of mast cells (number of cells by area) was performed by only one observer in the histological technique and by a video image analysis system in the immunohistochemical method.

Results

Thirty-three cases of mastocytosis were appraised, 21 of them belonging to the masculine sex. Ten cases (30,3%) presented mastocytoma, 21 (63,6%) urticaria pigmentosa

and 2 (6,1%) bullous mastocytosis. All patients of the sample were classified as having indolent mastocytosis and in 6 (18,8%) of them the association with systemic symptoms could be identified. Pruritus was the most frequent symptom, being related in 21 cases.

In 21 of the 33 cases dermal infiltration of mast cells was identified predominating in the perivascular region ($p=0,001$, exact test of Fisher). There were no significant differences regarding to the presence of infiltrated mast cells in the diverse cutaneous forms of mastocytosis or the systemic mastocytosis. The presence of eosinophils was identified in 15 cases (45,5%) and in 10 of them associated to the perivascular infiltrated of mast cells.

The density of mast cells in the histological technique, including all cases, was 50,00 cells/mm². There was no significant difference in the counting of cells, taking into account patients with mastocytoma in comparison with those with urticaria pigmentosa; the same happened when patients with or without systemic symptoms associated to cutaneous manifestations were considered.

The density of mast cells found with the immunohistochemical technique and the counting by the analysis of image was 158,85 cells/mm². There was no significant difference in the counting between the patients with mastocytoma and those with urticaria pigmentosa, and also between those ones with or without systemic symptoms.

Comparing the counting of mast cells by area (density) between the regular histology and the immunohistochemistry there was a significant difference ($p=0;0001$, non-parametric test of Wilcoxon). The mean of the difference among the countings was 199,98 cells/mm² ($\pm 365,31$ SD). Also, there was not resemblance between both methods in the mastocytoma and the urticaria pigmentosa groups ($p=0,005$ and $p=0,01$, respectively, non-parametric test of Wilcoxon). With the immunohistochemical technique, an increase of

518% in the number of mast cells could be demonstrated when compared with the histological method.

Conclusions

The present study allows to conclude that: 1) the preferential location of the infiltration of mast cells is dermic and perivascular, not being possible to identify histological differences between the cases of urticaria pigmentosa and mastocytoma; 2) the number of anti-tryptase monoclonal antibody marked mast cells and counted by digital image analysis in skin biopsies of children with clinical diagnosis of mastocytosis, was 159 cells by square millimeter; 3) the density of mast cells was similar in cases of urticaria pigmentosa and mastocytoma and also in those with and without associated systemic symptoms in both distincts techniques; 4) the number of mast cells, by square millimeter, marked by immunohistochemical technique and counted by image analysis was significantly greater than the number obtained by Giemsa staining and handy counting, with an average difference of 200 cells by square millimeter between both methods; 5) the density of mast cells marked by immunohistochemical technique was significantly greater in both, urticaria pigmentosa and mastocytoma cases, when compared with the regular histopathological technique, and 6) the use of the immunohistochemical technique and the digital image analysis counting allowed the detection of 518% more mast cells than the histological method.

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Definição

A mastocitose ou doença dos mastócitos abrange um grupo heterogêneo de condições crônicas caracterizado pela proliferação excessiva de mastócitos nos tecidos (GREAVES, 1998; KATSAMBAS et al., 1999). Os sinais e sintomas clínicos são decorrentes da distribuição anatômica dos mastócitos e do efeito funcional dos mediadores produzidos e liberados por estas células (LONGLEY et al., 1995; GYSEL e ORANJE, 2000). A pele é um dos órgãos mais frequentemente envolvidos, seja primária ou secundariamente, através da ação vasodilatadora das substâncias liberadas “in loco” ou em outros órgãos afetados (GREAVES, 1998).

1.2 Classificação

Diversas classificações têm sido propostas, gerando polêmica e dificuldade na comparação entre os resultados das pesquisas, principalmente no que se refere ao prognóstico. Contudo, uma das classificações mais citadas na literatura é a do Consenso de

1991, publicação realizada por K. Frank Austen e Dean D. Metcalfe, após uma mesa redonda nas Bermudas, em junho de 1990 (METCALFE, 1991b). Esta classificação divide a mastocitose em quatro categorias, enfatizando especialmente o prognóstico (**Tabela 1**).

Tabela 1 Classificação Revisada do Consenso sobre Mastocitose, 1991

I. Incipiente
A. Síncope
B. Doença cutânea
C. Doença ulcerosa
D. Má-absorção
E. Agregado de mastócitos na medula óssea
F. Doença esquelética
G. Hepatoesplenomegalia
H. Linfadenopatia
II. Doença Hematológica
A. Mieloproliferativa
B. Mielodisplásica
III. Agressiva
Mastocitose linfadenopática com eosinofilia
IV. Leucemia de mastócitos

Os pacientes na categoria I (incipiente) com envolvimento cutâneo ou de órgãos específicos têm um excelente prognóstico, sem alteração na expectativa de vida (METCALFE, 1991b). Esse grupo engloba oito manifestações diferentes, não sendo considerados subgrupos, pois podem estar presentes simultaneamente:

instabilidade hemodinâmica manifestada através de episódios repetidos de *flushing* e síncope;

mastocitose cutânea com comprometimento dérmico por aumento no número dos mastócitos dérmicos;

úlceras de estômago e duodeno associadas com aumento do ácido gástrico;

má-absorção devida à infiltração de mastócitos no intestino;

infiltração de mastócitos na medula óssea;

doença esquelética por atividade dos mastócitos nas superfícies ósseas;
hepatoesplenomegalia e
linfadenopatia secundária à presença de mastócitos naqueles tecidos.

A maioria das crianças, com diagnóstico de mastocitose, pertence ao grupo I, apresentando doença cutânea associada ou não a outras manifestações sistêmicas (GYSEL e ORANJE, 2000).

A categoria II, associada com doença hematológica, raramente é observada em crianças (METCALFE, 1999). Nesse grupo, o prognóstico é determinado pela evolução da doença hematológica associada.

Pacientes no grupo III têm uma forma agressiva de mastocitose, com desenvolvimento de linfadenopatia, hepatoesplenomegalia e eosinofilia proeminentes. Estes indivíduos, normalmente adultos, têm características prognósticas ruins, mas sem doença hematológica definida ou leucemia de mastócitos (METCALFE, 1999).

A quarta categoria é a leucemia de mastócitos. Esta é a forma mais rara e grave. O sangue periférico mostra numerosos mastócitos imaturos, sendo diferenciada das outras categorias por seu quadro clínico e histopatológico único (METCALFE, 1999).

1.3 Etiologia e Patogênese

Os mastócitos humanos originam-se de células pluripotenciais na medula óssea que expressam o antígeno CD34 na sua membrana celular; circulam através do sangue periférico para locais específicos do corpo onde irão maturar para células granuladas e se diferenciar em dois tipos distintos de mastócitos (BINGHAM III e AUSTEN, 1999;

GYSEL e ORANJE, 2000). A definição dos locais parece ser determinada pelas moléculas de adesão da superfície celular (WALSH et al., 1991; KATSAMBAS, 1999).

A regulação do número e da diferenciação dos mastócitos está sob controle de substâncias elaboradas na medula óssea e nos tecidos onde os mastócitos irão residir (LOVEREN et al., 1997). A maturação final da célula e a composição de seus grânulos depende dos fatores produzidos no microambiente tissular, incluindo o fator de crescimento de mastócitos (*stem cell factor* – SCF ou fator de células tronco) secretado por fibroblastos e células estromais (METCALFE, 1999). A inibição da produção local do SCF leva à apoptose dos mastócitos, confirmando a importância de sua ação reguladora (METCALFE, 1999).

A mastocitose pode representar muito mais uma hiperplasia reativa a um estímulo anormal do que um verdadeiro processo neoplásico de mastócitos. Este conceito é embasado por alguns estudos, entre eles o de Longley et al., que pesquisaram a expressão do gene do fator de crescimento de mastócitos na pele de pacientes com mastocitose cutânea, comparando-os com indivíduos normais. Concluíram que a distribuição alterada do SCF na pele de pacientes com mastocitose cutânea está de acordo com a produção anormal da forma solúvel deste fator e, portanto, ele poderia estar implicado no característico acúmulo de mastócitos (LONGLEY et al., 1993). Hamann et al. avaliaram o possível papel do SCF na mastocitose através de estudos imuno-histoquímicos com anticorpos contra o SCF e o seu receptor (o produto do *c-kit* proto-oncogene). Os dados demonstraram que algumas células epiteliais e mesenquimais expressaram o fator de células tronco. Em contraste com a relativa abundância destas células, somente mastócitos e melanócitos expressaram o seu receptor, sendo assim capazes de responder a este fator no tecido cutâneo. Desta forma, o SCF parece ser o responsável pelo aumento lesional de

mastócitos, bem como da pigmentação, na pele dos pacientes com mastocitose (LONGLEY et al., 1993; HAMANN et al., 1995a). O receptor para o SCF é o *c-kit*, um receptor tirosinase-quinase transmembrana (CD117), expresso nas células tronco hematopoiéticas, mastócitos, melanócitos e células de linhagem germinativa (ARBER et al., 1998; WOROBEK et al., 1998). Foram identificadas mutações no *c-kit* nas células sanguíneas periféricas e tissulares de pacientes com mastocitose. Estas mutações estão associadas com aumento na função do receptor e podem contribuir para o aumento no número de mastócitos, característicos da doença (NAGATA et al., 1995; NAGATA et al., 1997; WOROBEK et al., 1998).

Os mastócitos dérmicos são células ovais ou fusiformes, mononucleares e eventualmente binucleares, e apenas raramente mostram sinais de mitose na pele normal. Sua maior característica discriminatória está nos numerosos grânulos citoplasmáticos redondos que permanecem ortocromáticos quando corados por *alcian blue* e safranina ou metacromáticos com azul de toluidina e Giemsa. As células têm afinidade por avidina, o que facilita sua identificação por imunofluorescência ou por imuno-histoquímica através do complexo avidina-biotina-peroxidase.

Os mastócitos estão distribuídos próximos aos vasos sanguíneos, nervos e apêndices. Na pele normal, estas células são mais numerosas na derme subpapilar e na região do plexo vascular dérmico superficial (HAMANN et al., 1995a; EADY et al., 1998; GREAVES, 1998).

Há duas subpopulações distintas de mastócitos, diferenciáveis principalmente com base no seu conteúdo de protease (SCHWARTZ et al., 1987; GYSEL e ORANJE, 2000). Os mastócitos MC^{TC} contêm triptase e quimase, ao passo que os mastócitos MC^T contêm somente triptase e são pouco frequentes na pele. Os mastócitos MC^{TC} têm grânulos

dispostos ultra-estruturalmente num padrão de treliça (*lattice pattern*) e representam 90% do total na pele. Os 10% restantes estão divididos entre o tipo MC^T, com um padrão em rolo de pergaminho (*scroll-like pattern*) ou são indeterminados, possuindo ambos os tipos de grânulos (WEIDNER et al., 1991). Na **Tabela 2** estão relacionadas as características morfológicas mais importantes dessas células (WEIDNER et al., 1991; WEBER et al., 1995; GREAVES, 1998; GYSEL e ORANJE, 2000).

Tabela 2 Características morfológicas e localizações das subpopulações de mastócitos

Características	MC^{TC}	MC^T	Indeterminado
Frequência (%)	90	<10	<10
Ultraestrutura granular	Treliça	Rolo de pergaminho	Misto
Principais locais	Pele Mama Lifonodos axilares Submucosa intestinal	Mucosa intestinal Parede alveolar	

MC^{TC} = mastócitos triptase-quimase MC^T = mastócitos triptase

Os fatores que determinam os fenótipos da população de mastócitos, em um tecido específico, não estão bem estabelecidos, mas o microambiente provavelmente seja importante (GREAVES, 1998).

Os mastócitos têm a capacidade de gerar uma grande quantidade de mediadores que são responsáveis pelos efeitos a curto e a longo prazo, nos órgãos alvos. O conjunto de sintomas clínicos associados à mastocitose é o resultado do aumento da produção ou liberação destes mediadores, os quais têm efeitos tanto nos seus locais de produção quanto nos locais distantes da sua origem, independentemente da etiologia do aumento dos mastócitos ou da categoria da doença. Esses mediadores podem circular através dos vasos sanguíneos ou linfáticos para produzir os efeitos biológicos observados nos pacientes com mastocitose (METCALFE, 1999).

Os mastócitos geram uma variedade de moléculas farmacologicamente potentes e capazes de regular numerosos eventos fisiológicos e imunológicos. Sugere-se que esta célula, pela sua capacidade de aumentar tanto o fluxo sanguíneo local quanto recrutar células imunes para os tecidos, tenha uma função muito importante na defesa inicial contra organismos infecciosos invasores, proteínas estranhas e, possivelmente, células neoplásicas (SONTHEIMER e THARP, 1993).

Em certas respostas inflamatórias dependentes de IgE, os mastócitos podem ter o papel de iniciadores primários da reação; em outras situações, a sua função pode ser a de influenciar a inflamação, mesmo a iniciada por mecanismos independentes (GALLI, 1993). O papel potencial dos mastócitos, como primeira linha de defesa, é reforçado pela demonstração que estas células produzem o fator de necrose tumoral alfa (*tumor necrosis factor alpha* – TNF- α). Em contraste com outras células que apenas sintetizam esta citocina, o mastócito, além de gerá-la, também a estoca em seus grânulos citoplasmáticos. Após estímulo com anticorpos IgE, os mastócitos têm a capacidade de produção adicional de TNF- α , indicando que são uma fonte imediata e abundante desta citocina. O TNF- α induz a expressão de moléculas de adesão na superfície luminal das células endoteliais, bem como promove a produção de fatores pró-coagulantes por estas células. Esta citocina também estimula a quimiotaxia de polimorfonucleares e aumenta diretamente a capacidade fagocitária e a produção de radicais de oxigênio (SONTHEIMER e THARP, 1993; WALSH et al., 1991).

Os mastócitos têm ainda a capacidade de liberar o fator de crescimento de fibroblastos, um potente polipeptídeo angiogênico e mitogênico, reforçando a sua importância no desenvolvimento da reação inflamatória após agressões químicas ou imunológica (QU et al., 1995). Eles também são capazes de gerar várias outras citocinas,

incluindo as interleucinas 1,3,4,5, e 6. A interleucina 3, em sinergia com outros mediadores promove o recrutamento e ativação dos eosinófilos nos tecidos e participa da síntese de eicosanóides; a interleucina 4 está relacionada com a ativação de linfócitos e monócitos e a interleucina 5 com a diferenciação de eosinófilos (SONTHEIMER e THARP, 1993; DELVES e ROITT, 2000b).

Resumidamente, os mastócitos são ativados por antígenos IgE específicos ou através de outros mecanismos. As citocinas derivadas dos mastócitos e outros mediadores afetam as células já presentes no tecido, incluindo as células neurais e as endoteliais. Entre os efeitos das citocinas está o recrutamento de leucócitos e também sua ação sobre estas células, como o aumento de sobrevivência e a modulação da sua função. O recrutamento dos leucócitos contribui para a amplificação e progressão da reação; em parte, pelo aumento da concentração local de algumas citocinas produzidas pelos mastócitos (por exemplo o TNF- α) ou pela produção adicional por outras células (GALLI, 1993).

Os principais mediadores pré-formados (associados aos grânulos) e os gerados nos mastócitos cutâneos são vistos na **Tabela 3** (LONGLEY et al., 1995; LOVEREN et al., 1997; GREAVES, 1998; DELVES e ROITT, 2000a; GYSEL e ORANJE, 2000).

Tabela 3 Relação dos mediadores pré-formados e gerados nos mastócitos

Classe	Pré-formados	Gerados
Amina	Histamina Serotonina	
Protease	Triptase Quimase Carboxipeptidase	
Glicosaminoglicano	Heparina	
Eicosanóide		Prostaglandina D2 Leucotrieno C4 Fator ativador de plaquetas
Citocina	Fator de necrose tumoral alfa	Fator de necrose tumoral alfa Fator de crescimento de fibroblasto Interleucinas

O conceito de que a rede neural e os mastócitos formam uma unidade interativa capaz de influenciar as respostas imunes e inflamatórias tem recebido maior atenção nos últimos anos. Anatomicamente, os mastócitos estão localizados próximos às fibras nervosas e sugere-se que estejam sob controle neural. Foi proposto que, na pele humana, durante um reflexo axônico há a liberação de substância P (taquicinina) que degranula a histamina dos mastócitos e outros mediadores, como o TNF- α (LOVEREN et al., 1997). A substância P e outros neurotransmissores, pelas suas capacidades de alterar a permeabilidade e o tônus vascular, ajudam a regular o fluxo de nutrientes e células na derme. Estes neuropeptídeos servem como agentes importantes da inflamação por iniciar a liberação de outros mediadores dos mastócitos bem como facilitar o recrutamento de proteínas inflamatórias e células através da barreira endotelial (SONTHEIMER e THARP, 1993).

A compreensão de que as citocinas podem ser responsáveis por muitas das conseqüências clinicamente importantes da ativação dos mastócitos e a demonstração da interação ativa dos mastócitos com outras células dérmicas tem esclarecido não somente a

patogênese de várias doenças envolvendo estas células, bem como, com certeza, terá implicações terapêuticas no futuro (GALLI, 1993).

1.4 Epidemiologia

A prevalência da mastocitose na população geral é difícil de determinar pois muitos casos são autolimitados, não diagnosticados ou não relatados (GYSEL e ORANJE, 2000). Estima-se que na infância esteja próxima de 5,4 casos em cada 1000 crianças atendidas em ambulatório ou clínica de Dermatologia Pediátrica (FERNÁNDEZ et al., 1998).

1.5 Mastocitose Familiar

A maioria dos pacientes não tem história familiar de mastocitose (SOTER, 1991). Porém, são citados, na literatura, casos familiares de mastocitose, como a manifestação de urticária pigmentosa em gêmeos idênticos ou não e em trigêmeos (SOTER, 1991). Em várias famílias estudadas, formas variadas de mastocitose puderam ser identificadas, afetando mais de um membro, inclusive com o comprometimento de três gerações (SOTER, 1991; CHANG et al., 2001).

Kettelhut cita que na população pediátrica estudada no *National Institutes of Health*, não foram identificados casos de mastocitose que pudessem ser classificados como familiares (KETTELHUT e METCALFE, 1991).

1.6 História

As características clínicas da mastocitose cutânea foram descritas inicialmente por Nettleship, em 1869, que relatou o caso de uma menina com uma forma de urticária pouco usual, com quase dois anos de duração (METCALFE, 1991a; LONGLEY et al., 1995). Esta manifestação, posteriormente, recebeu o nome de urticária pigmentosa (UP). Ehrlich, oito anos após, descobriu os mastócitos e descreveu sua localização na pele e nos outros órgãos e também o processo de degranulação e a associação dos mastócitos com os vasos sanguíneos, nervos, inflamações e neoplasias (METCALFE, 1991a; LONGLEY et al., 1995; GYSEL e ORANJE, 2000).

1.7 Manifestações Cutâneas da Mastocitose

As manifestações cutâneas da mastocitose são: urticária pigmentosa, mastocitose cutânea difusa (MCD), mastocitomas e *telangiectasia macularis eruptiva perstans* (GYSEL e ORANJE, 2000). Embora muitos órgãos além da pele possam estar envolvidos, a apresentação mais comum é a cutânea (DIBACCO e DELEO, 1982; STEIN, 1986; TRAVIS et al., 1988; GYSEL e ORANJE, 2000). As quatro categorias têm características clínicas que são devidas ao excesso de produção de mediadores dependentes dos mastócitos, embora alguns aspectos da doença possam predominar em um tipo específico.

A mastocitose cutânea recebe a denominação de *telangiectasia macularis eruptiva perstans* quando as telangiectasias são a característica predominante, com pouca

pigmentação e edema. Praticamente não ocorre na infância e nos adultos ela é persistente e pouco responsiva ao tratamento.

Lesões solitárias chamadas de **mastocitomas** são uma das apresentações características da mastocitose em pediatria (KETTELHUT e METCALFE, 1991). Representam 15% dos casos da moléstia e, na maioria das vezes, as lesões envolvem espontaneamente. Apresentam-se como nódulos vermelhos, rosados ou amarelados, com 3 a 4 cm de diâmetro, podendo ser múltiplos (**Figura 1**). Na infância, são assintomáticos ou com edema quando friccionados, podendo desencadear *flushing* e hipotensão (KETTELHUT e METCALFE, 1991).



Figura 1 Mastocitoma solitário.

A **mastocitose cutânea difusa** é uma variedade rara e consiste numa infiltração difusa da pele com mastócitos, podendo ter lesões isoladas. Usualmente, todo o tegumento está envolvido, manifestando-se através de um espessamento difuso, de consistência empastada, semelhante ao couro, com coloração normal ou amarelo-acastanhada e prurido intenso. Os locais isolados afetados são axilas e região inguinal. A apresentação da MCD pode ser sistêmica, com hepatoesplenomegalia (GREAVES, 1998; METCALFE, 1999).

Na infância, entre as expressões cutâneas da mastocitose, a que ocorre com maior frequência é a **urticária pigmentosa** (LOUBEYRES et al., 1999). Ela é vista em mais de 90% dos pacientes com doença leve e em menos de 50% daqueles com mastocitose associada à doença hematológica ou com linfadenopatia e eosinofilia (GREAVES, 1998). As lesões de UP caracterizam-se por máculas eritemato-acastanhadas ou pápulas levemente elevadas e esparsas, com as bordas pouco definidas (**Figuras 2 e 3**). As palmas, plantas, face e couro cabeludo podem estar livres de lesões. Traumas leves, incluindo escoriação ou atrito, normalmente causam urticaria e eritema perilesional, conhecidos como sinal de Darier (**Figura 4**). Urticária pigmentosa está associada com uma intensidade variável de prurido que pode ser exacerbado por alterações climáticas, fricção da pele, ingestão de bebidas quentes ou comidas condimentadas, álcool e certos medicamentos, todos mecanismos que favorecem a degranulação de mastócitos com a liberação de mediadores químicos (DIBACCO e DELEO, 1982; STEIN, 1986; GYSEL e ORANJE, 2000).



Figura 2 Urticária pigmentosa.



Figura 3 Urticária pigmentosa.



Figura 4 Urticária pigmentosa com sinal de Darier.

Lesões cutâneas bolhosas podem manifestar-se e acompanhar todas as formas de mastocitose, porém, quando esta apresentação é a predominante, é denominada de **mastocitose bolhosa (MB)** (**Figuras 5 e 6**) (MURPHY et al., 1999). Esta variedade, mais rara, ocorre em crianças e está associada com envolvimento sistêmico e prognóstico mais reservado, inclusive com o relato de casos que evoluíram ao óbito (DIBACCO e DELEO, 1982; LONGLEY et al., 1995; MURPHY et al., 1999).

Em alguns pacientes, os sinais e sintomas produzidos pelos efeitos funcionais dos mediadores derivados dos mastócitos podem dominar o quadro clínico, sendo o prurido o sintoma mais freqüente (KETTELHUT e METCALFE, 1991).



Figura 5 Mastocitose bolhosa.



Figura 6 Mastocitose bolhosa.

1.8 Manifestações Sistêmicas da Mastocitose

O comprometimento sistêmico da mastocitose pode ser definido como o aumento anormal de mastócitos em locais diferentes da pele (THARP, 1995; GREAVES, 1998). Os sinais e sintomas são decorrentes da liberação dos mediadores ou da infiltração de mastócitos nos órgãos alvos.

Em pacientes adultos, com mastocitose leve, o comprometimento hepático é pouco freqüente, embora as provas funcionais sejam anormais na metade dos casos e hepatoesplenomegalia possa ser detectada em 40% deles (HORAN e AUSTEN, 1991). Manifestações como hipertensão porta e ascite decorrentes de fibrose hepática, são mais comuns em doentes com mastocitose agressiva ou doenças hematológicas concomitantes (METCALFE, 1991c).

As alterações de medula óssea consistem em agregados paratrabeculares de mastócitos fusiformes, freqüentemente misturados com eosinófilos, linfócitos e ocasionalmente plasmócitos, histiócitos e fibroblastos (CZARNETZKI et al., 1988; HORNY e KAISERLING, 1988). Elas raramente são vistas em crianças. Anemia, leucopenia, leucocitose, trombocitopenia ou eosinofilia podem, entretanto, ocorrer em associação com doença sistêmica (KATSAMBAS et al., 1999). Sangramento prolongado na pele ou no trato gastrointestinal tem sido observado nos pacientes pediátricos com mastocitose, principalmente, naqueles com MCD (KETTELHUT e METCALFE, 1991). Além destas manifestações hematológicas, já foi relatada a ocorrência de displasia ou neoplasia de células mielóides com mastocitose sistêmica, principalmente em pacientes adultos (TRAVIS et al., 1988; HORNY et al., 1990). Há somente dois casos relatados de doença maligna hematológica em crianças, ambos com mastocitose sistêmica e não há

nenhuma referência à coexistência de UP isolada com doença maligna linfoproliferativa em crianças (GÜLER et al., 2001).

A infiltração da medula óssea com mastócitos pode determinar comprometimento ósseo e o mesmo é detectável, na maioria dos casos, através de lesões líticas ou condensadas na radiografia (KATSAMBAS et al. 1999). Os ossos longos proximais são os mais comumente afetados, seguidos pela pelve, costelas e crânio. A cintilografia óssea é o exame mais sensível para detectar e localizar lesões ativas. Dores ósseas acometem de 19 a 28% dos pacientes e, naqueles com doença mais grave ou avançada, podem ocorrer fraturas patológicas (METCALFE, 1999).

O envolvimento do trato gastrointestinal, pela mastocitose, é relacionado na literatura como um evento incomum (DIBACCO e DELEO, 1982). As principais manifestações em crianças seriam os sintomas digestivos por ulceração péptica e má-absorção pela atrofia de vilos. Hipersecreção gástrica devida ao aumento sérico de histamina resultando em gastrite e úlcera péptica seriam os problemas mais comuns, bem como diarreia e dor abdominal, relacionadas com má-absorção em até um terço dos casos (KETTELHUT e METCALFE, 1991; METCALFE, 1999).

A associação de mastocitose sistêmica com tumores sólidos já foi descrita em adultos (HORNY et al., 1986). Recentemente, foi publicado o primeiro caso de uma criança de 4 anos com UP que desenvolveu tumor de Wilms, podendo ser ou não um achado casual (GÜLER et al., 2001).

Pacientes com mastocitose, muitas vezes, apresentam sintomas cardiovasculares, como *flushing*, hipotensão, taquicardia, síncope e choque (LONGLEY et al., 1995; GREAVES, 1998; GYSEL e ORANJE, 2000). Tais reações são secundárias aos efeitos dos mediadores liberados pelos mastócitos por agentes que estimulam a sua degranulação. Os

degranuladores identificados compõem uma lista extensa e os mais relevantes são citados na **Tabela 4** (LONGLEY et al., 1995; LEAF et al., 1996; GREAVES, 1998; GYSEL e ORANJE, 2000).

Tabela 4 Principais degranuladores de mastócitos

Degranuladores de mastócitos

Estímulo imunológico (Anti-IgE via receptor IgE de alta afinidade)
 Anafilotoxinas derivadas do complemento (C5a, C3)
 Estímulo físico (calor, frio, luz solar, fricção)
 Toxinas bacterianas
 Venenos (cobras, Hymenoptera)
 Polipeptídeos biológicos (de áscaris, água-viva, lagosta, veneno de vespa e abelha)
 Polímeros (dextrano)
 Medicamentos
 Ácido acetilsalicílico
 Álcool
 Narcóticos (codeína, morfina)
 Polimixina B
 Anfotericina B
 D-Tubocurarina
 Quinina
 Contrastes radiográficos contendo iodo
 Escopolamina
 Galamina
 Decametônio
 Reserpina

1.9 Diagnóstico

O diagnóstico de mastocitose é suspeitado clinicamente e confirmado pela histologia (METCALFE, 1999; THARP, 1995). Na maioria dos casos, o diagnóstico de mastocitose cutânea pode ser feito através da anamnese e exame físico, com a identificação das características das lesões e a demonstração do sinal de Darier. Uma biópsia de pele para identificar infiltrado mastocitário dérmico é o teste mais frequentemente utilizado e

confirmatório (STEIN, 1986; LONGLEY et al., 1995). Há alguns sinais que auxiliam no diagnóstico da forma sistêmica: hepatomegalia, esplenomegalia e linfadenopatia no exame físico, envolvimento ósseo visto em exame radiológico ou cintilográfico e aumento de mastócitos na biópsia hepática ou de medula óssea (THARP, 1995). Atualmente, a demonstração de um aumento de mastócitos nas lesões cutâneas características se constitui no principal critério para o diagnóstico de mastocitose. Em certos pacientes suspeitos de ter mastocitose sistêmica mas sem sintomas e sinais característicos da doença, testes como níveis séricos ou urinários de mediadores de mastócitos podem ser úteis (KETTELHUT e METCALFE, 1987; THARP, 1995; GYSEL et al., 1996). Os estudos adicionais são determinados pelos sintomas ou pelos achados durante a avaliação rotineira (METCALFE, 1991b).

1.10 Diagnóstico Diferencial

No diagnóstico diferencial deve ser lembrado de histiocitose, sífilis secundária, sarcoidose papulosa e capilaropatias. A mastocitose bolhosa deve ser diferenciada da incontinência pigmentar, das piodermites e de outras doenças bolhosas da infância (GYSEL e ORANJE, 2000).

1.11 Tratamento

O principal objetivo do tratamento de todas as categorias de mastocitose é o controle dos sinais e sintomas determinados ou provocados pela liberação dos mediadores dos mastócitos. Os pacientes devem sempre evitar e prevenir o uso de agentes degranuladores dos mastócitos. Tanto em adultos quanto em crianças os antagonistas dos receptores H1 são úteis em reduzir prurido, *flushing*, o sinal de Darier e a taquicardia. Se forem insuficientes, a adição de um antagonista H2 pode ser benéfica. Apesar disto, muitas vezes os sintomas persistem; em parte, pela incapacidade de bloquear os efeitos dos altos níveis de histamina e a presença de outros mediadores (METCALFE, 1991d; METCALFE, 1999).

O cromoglicato dissódico inibe a degranulação dos mastócitos e pode ter alguma eficácia no tratamento, particularmente no alívio dos sintomas gastrointestinais, apesar de não diminuir os níveis séricos ou urinários de histamina (METCALFE, 1999).

Entre outros tratamentos citados na literatura, na maioria relatos ou série de casos, estão: cetotifeno, como estabilizador da membrana celular dos mastócitos e com propriedades anti-histamínicas; adrenalina, usada nos episódios de colapso vascular; tratamento fotoquimioterápico com psoraleno e ultravioleta A, que induz a uma diminuição temporária dos mastócitos dérmicos; interferons associados ou não com corticóides sistêmicos, para pacientes com mastocitose sistêmica (DELAPORTE et al., 1995; STEGE et al., 1996; GREAVES, 1998; KATSAMBAS et al., 1999; METCALFE, 1999). Glicocorticóides tópicos podem ser usados na UP extensa ou na MCD. À medida que as lesões se tornam mais claras, o número de mastócitos diminui; elas eventualmente podem recorrer após o término do tratamento, mas a melhora pode durar mais de 1 ano (KETTELHUT e METCALFE, 1991). Acredita-se que a resposta aos glicocorticóides seja consequência da redução da produção tecidual do fator de células tronco (SCF), necessário

para a sobrevivência dos mastócitos locais (FINOTTO et al., 1997). Nas crianças, os corticóides tópicos devem ser usados em pequenas áreas e com muita cautela pelo risco de supressão adrenal, devida ao uso crônico (KETTELHUT e METCALFE, 1991).

1.12 Prognóstico

Os pacientes com UP ou com mastocitoma têm, em geral, um excelente prognóstico. O número de lesões na UP pode continuar a aumentar após o seu início, primeiro, de uma forma rápida e após, gradualmente, até atingir um platô. Cerca de metade dos casos de UP na infância apresentarão resolução das lesões e sintomas durante a adolescência e os casos restantes exibirão uma acentuada redução nos sintomas das lesões cutâneas (LOUBEYRES et al., 1999; MIDDELKAMP HUP et al., 2002). Contudo, a progressão para comprometimento sistêmico ocorre em 10% das crianças com UP, nas quais a primeira manifestação aparece após os 5 anos de idade (METCALFE, 1991a). Quando não ocorre a regressão espontânea da doença durante a puberdade ou naqueles pacientes que apresentam alterações sangüíneas periféricas, linfadenopatia, hepatomegalia ou esplenomegalia, deve ser realizada uma investigação sistêmica mais detalhada e um acompanhamento mais rigoroso, pois estas características podem indicar um prognóstico mais reservado (BAKOS et al., 1972; METCALFE, 1999).

Crianças que apresentam lesões bolhosas como primeiro sinal de mastocitose também parecem ter um prognóstico pior em relação àquelas crianças com mastocitose cutânea difusa e com posterior surgimento de bolhas (DIBACCO e DELEO, 1982; MURPHY et al., 1999).

É importante salientar que a associação ou o desenvolvimento de doenças malignas, como leucemia de mastócitos, é rara em crianças com mastocitose, ao contrário do que ocorre em adultos (STEIN, 1986; GYSEL e ORANJE, 2000).

2 JUSTIFICATIVA

A mastocitose é uma doença caracterizada pelo acúmulo desordenado de mastócitos em vários órgãos, manifestando-se através de um amplo espectro de alterações clínicas. A doença pode envolver, além da pele, órgãos internos, incluindo a medula óssea, trato gastrointestinal, sistema esquelético e linforreticular (baço, fígado e linfonodos). O conjunto dos sintomas é o resultado do aumento da produção ou liberação de mediadores formados pelos mastócitos, os quais agem tanto nos seus locais de produção quanto em zonas distantes da sua origem, pois circulam através dos vasos sanguíneos e linfáticos para produzir os efeitos biológicos observados.

O início das manifestações da mastocitose pode ocorrer em qualquer idade, porém, na grande maioria dos casos, ela é vista nos primeiros 15 anos. Na infância, a doença é considerada, na maioria das vezes, uma condição benigna, cujo comprometimento característico é o cutâneo. As mais freqüentes manifestações na pele são os mastocitomas e a urticária pigmentosa.

O diagnóstico da doença é suspeitado clinicamente e confirmado através da histologia. Atualmente, a demonstração do aumento do número de mastócitos em lesões cutâneas características constitui-se no principal critério para o diagnóstico da mastocitose.

Apesar da mastocitose ser uma doença reconhecida há mais de cem anos, apenas nas últimas décadas tem crescido o interesse pelos mastócitos. As propriedades imunológicas e a importância clínica destas células têm sido objeto de intenso estudo. Evidências recentes mostram que o mastócito tem um papel relevante, porém, ainda pouco definido, como marcador imunológico cutâneo. Para compreender a significância dos mastócitos nas doenças é indispensável identificá-los e enumerá-los com acurácia nos tecidos. Um dos métodos rotineiros para a demonstração dessas células é através da sua coloração metacromática com o Giemsa e após a sua contagem manual em diversos campos de grande aumento. Pode-se enumerar uma série de problemas com este método, como por exemplo: uma proporção significativa de mastócitos não apresentarem a metacromasia esperada após a fixação padrão em formalina; a presença de grande número de mastócitos degranulados, o que ocorre facilmente, até mesmo com o manuseio da pele, necessário à anestesia e realização da biópsia; a subjetividade da contagem das células, dependente do observador e dos campos escolhidos. É sugerido que esses fatores complicadores levem a uma subestimação do número de mastócitos nos tecidos e, desta forma, a contribuição destas células nos estados de certas doenças não estaria sendo completamente e adequadamente investigada. Acredita-se que o uso de anticorpos, com especificidade para mastócitos, seja uma técnica complementar valiosa aos métodos histológicos convencionais, permitindo uma identificação mais precisa do mastócito e, desta forma, uma investigação do seu papel na gênese de várias doenças, não só cutâneas mas também hematológicas, ósseas e gastrointestinais. Além disso, a cuidadosa localização e quantificação das células é o passo inicial para estudos funcionais.

Os quadros clínicos da mastocitose com apresentações e prognósticos diferentes entre crianças e adultos evidenciam a necessidade do desenvolvimento de exames

complementares mais acurados na identificação dos mastócitos para que se estabeleçam os fatores de evolução da doença.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Quantificar o número de mastócitos marcados com anticorpo monoclonal antitriptase, através de técnica imuno-histoquímica e análise de imagem, em biópsias cutâneas de crianças com diagnóstico clínico de mastocitose.

3.2 Objetivos Específicos

Descrever os achados histológicos com as colorações hematoxilina-eosina (HE) e Giemsa.

Quantificar o número de mastócitos marcados com o anticorpo antitriptase entre as diferentes expressões clínicas da mastocitose cutânea (mastocitoma, urticária pigmentosa e mastocitose bolhosa).

Comparar o número de mastócitos marcados com o anticorpo antitriptase entre os casos de mastocitose cutânea e mastocitose sistêmica.

Correlacionar as contagens de mastócitos entre os dois diferentes métodos (coloração por Giemsa com contagem manual e marcação com anticorpo antitriptase e análise digital).

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Delineamento da Pesquisa

Série de casos.

4.2 População e Amostra

Crianças de 0 a 14 anos, com diagnóstico clínico de mastocitose, confirmado por biópsia cutânea.

As formas clínicas de mastocitose cutânea foram definidas como:

- mastocitoma – nódulo único ou múltiplos, vermelhos, rosados ou amarelados, com presença do sinal de Darier;
- urticária pigmentosa - máculas eritêmato-acastanhadas ou pápulas levemente elevadas e esparsas, com as bordas pouco definidas, com presença do sinal de Darier;
- mastocitose bolhosa – lesões cutâneas bolhosas predominantes, acompanhando outras formas de mastocitose.

A mastocitose foi definida como sistêmica na associação de uma das formas de mastocitose cutânea com sinais, sintomas ou achados laboratoriais que indicassem comprometimento ósseo, gastrointestinal, linforreticular, hematopoiético ou cardiovascular.

4.3 Processo de Amostragem

4.3.1 Cálculo do Tamanho da Amostra

Como a mastocitose é pouco freqüente e não existem dados específicos sobre achados imuno-histoquímicos nas diferentes formas cutâneas da doença, não foi possível calcular o tamanho da amostra, sendo obtida uma amostra de demanda.

4.3.2 Critérios de Inclusão

Foram elegíveis para o estudo todos os casos de crianças de 0 a 14 anos, inclusive, que tiveram diagnóstico clínico de uma das formas de mastocitose cutânea, com biópsias de pele viáveis, atendidas no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) ou em outros Serviços de Dermatologia nos últimos 5 anos.

4.3.3 Critérios de Exclusão

Foram excluídos os casos com dados insuficientes para a classificação da mastocitose cutânea, que não preencheram os critérios de inclusão ou aqueles nos quais o

material tenha sido considerado inadequado ou insuficiente para os estudos histológicos e imuno-histoquímicos.

4.4 Variáveis em Estudo

Diferentes expressões clínicas da mastocitose cutânea (urticária pigmentosa, mastocitoma e mastocitose bolhosa);

mastocitose sistêmica (sinais, sintomas ou achados laboratoriais indicando manifestação sistêmica da doença);

achados histológicos nas diferentes manifestações clínicas;

número de mastócitos por área (densidade) corados por Giemsa e contados manualmente;

número de mastócitos por área (densidade) marcados com anticorpo monoclonal antitriptase e contados por análise digital.

4.5 Locais de Realização

O estudo foi realizado com o auxílio das seguintes instituições e colaboradores:

Serviço de Dermatologia do HCPA;

Serviço de Dermatologia da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre;

Serviço de Patologia do HCPA;

Laboratório de Patologia Dr. Jorge David Zanol; e

Dr. Vinícius Duval da Silva.

4.6 Considerações Éticas

O projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde do HCPA, com nº 00.261.

Deve-se salientar que todas as amostras foram mantidas anônimas e que as novas informações não irão beneficiar diretamente o próprio paciente.

4.6.1 Consentimento Informado

Não foi obtido o consentimento informado dos pacientes sobre a utilização do material da biópsia cutânea utilizada nesta pesquisa baseando-se na Resolução Normativa 02/97 letra “c” sobre Utilização de Material Biológico Descartado em Projetos de Pesquisa da Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde, vinculada ao Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG) do HCPA (**Anexo1**).

4.6.2 Termo de Compromisso para Utilização de Dados

Como houve necessidade de consultar o prontuário do paciente para coleta de dados complementares, garantiu-se a privacidade dos dados e o anonimato dos indivíduos quando da divulgação dos resultados, através do Termo de Compromisso para Utilização de Dados, da Resolução Normativa 01/97 sobre Utilização de Dados de Prontuários de Pacientes e de

Bases de Dados em Projetos de Pesquisa da Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde, vinculada ao GPPG do HCPA (**Anexo 2**).

4.7 Logística

4.7.1 Identificação dos Casos

A identificação dos casos elegíveis para o estudo foi feita através de:

- revisão de diagnósticos de mastocitose no Serviço de Arquivo Médico e Informações em Saúde (SAMIS) do HCPA, nos últimos 5 anos;
- revisão nos registros de diagnósticos anátomo-patológicos e arquivo de fotografias do Serviço de Dermatologia do HCPA nos últimos 10 anos, de acordo com os dados disponíveis;
- revisão dos diagnósticos dos exames anátomo-patológicos do Laboratório de Patologia Dr. Jorge Zanol, dos últimos 5 anos;
- revisão dos registros de fotografias do Serviço de Dermatologia da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, dos últimos 5 anos.

Após, foram localizados os prontuários para obter a história clínica do caso, quando originário dos hospitais. Para os casos provenientes de consultórios privados, os dados foram obtidos diretamente do médico responsável.

Cada paciente recebeu um número e foi preenchida uma ficha com os dados de identificação, história, exame físico e avaliação laboratorial (**Anexo 3**).

4.7.2 Análise dos Cortes em Parafina

Os fragmentos de pele fixados em formalina e emblocados em parafina utilizados para diagnóstico histopatológico convencional foram cedidos pelo Serviço de Patologia do HCPA, Laboratório de Patologia da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre e Laboratório Dr. Jorge David Zanol.

As amostras foram cortadas em secções de 5 µm e preparados, no mínimo, 6 cortes seriados por peça, sendo utilizado o primeiro para a técnica de imuno-histoquímica, um para coloração com hematoxilina-eosina, outro para Giemsa e os três restantes armazenados.

Foi utilizado microscópio Zeiss (Alemanha), modelo Standard 20, com 4 objetivas planacromáticas e ocular de 10 aumentos.

As variáveis consideradas na avaliação histopatológica das lâminas coradas por Giemsa e comparadas com hematoxilina-eosina foram:

contagem do número de mastócitos dérmicos em no mínimo 5 campos de 200 aumentos (0,264 mm² por campo);

presença de:

- infiltração dérmica de mastócitos,
- mastócitos perivasculares,
- mastócitos perineurais,
- agregados nodulares de mastócitos,
- eosinófilos;

ocorrência de clivagem.

Todas as lâminas foram interpretadas por um investigador que desconhecia a identificação e diagnóstico do paciente e os resultados anotados numa ficha padrão (**Anexo 4**).

4.7.3 Técnica de Imuno-histoquímica

Substâncias utilizadas:

- 1- Solução de organo silano (3-aminopropil-trietoxisilano) a 3% em acetona: para preparar as lâminas antes de receberem o corte.
- 2- Solução tampão de fosfato (*Phosphate Buffered Saline – PBS*), em pH 7,2: utilizada para diluir o soro e os anticorpos e lavar o excesso de reagente dos cortes.
- 3- Tripsina 0,25%: utilizada para proteólise e recuperação antigênica.
- 4- Solução de peróxido de hidrogênio a 5% em água destilada: utilizada para bloquear a peroxidase endógena presente nos cortes de tecidos.
- 5- Soro normal: leite em pó desnatado a 5% em PBS. Indicado para impedir reações de fundo bloqueando epítomos que poderiam reagir de forma inespecífica. Esta etapa torna a reação mais específica, sem colorações de fundo.
- 6- Anticorpo primário: triptase de mastócitos - anticorpo monoclonal obtido de ratos imunizados com triptase de mastócitos humanos isolados de tecido pulmonar. Clone AA1, isotipo IgG1, kappa (DAKO, Dinamarca). Liga-se especificamente aos grânulos secretados de mastócitos. Utilizado na diluição de 1:100 em PBS.

7- Anticorpo secundário: imunoglobulina ligada à biotina anti-imunoglobulina de coelho, rato e cabra (DAKO, EUA).

8- Estreptavidina peroxidase: estreptavidina conjugada a peroxidase (DAKO, EUA).

9- Substrato revelador para peroxidase: solução cromógena de 3-3'-tetracloroeto de diaminobenzidina (DAB) (DAKO, EUA), diluído 20 µl em 1 ml do diluente.

Descrição da técnica:

1- Desparafinizar o corte com 3 banhos de xilol por 10, 5 e 5 minutos, respectivamente; desidratar por 5 minutos numa seqüência de álcool 99%, 95%, 80% e 70%; lavar com água corrente e finalmente imergir em PBS por 5 minutos.

2- Induzir proteólise através de uma solução de tripsina 0,25% durante 30 minutos.

3- Lavar com água corrente, água destilada e após manter em PBS por 5 minutos.

4- Recobrir com solução de peróxido de hidrogênio a 5% em água destilada e manter em câmara escura por 20 minutos, 2 vezes.

5- Lavar com água corrente, água destilada e após manter em PBS, por 5 minutos. Incubar com soro normal 5% em PBS, por 35 minutos.

6- Lavar com água corrente, água destilada e PBS.

7- Circular o corte com substância hidrófoba, para manter os líquidos sobre o corte e evitar o desperdício dos reagentes.

8- Recobrir com o anticorpo primário e manter em câmara úmida e escura por 2 horas, em temperatura ambiente.

9- Lavar a lâmina separadamente com PBS e após manter incubada por 5 minutos, 3 vezes.

10- Aplicar o anticorpo secundário e manter por 30 minutos em câmara úmida.

- 11- Lavar com PBS por 5 minutos, 3 vezes.
- 12- Incubar com estreptavidina peroxidase por 30 minutos.
- 13- Lavar com PBS, por 5 minutos, 3 vezes.
- 14- Recobrir com DAB diluído por cerca de 5 a 10 segundos.
- 15- Lavar com água destilada, 2 vezes.
- 16- Contracorar com hematoxilina de Harris, por 20 a 30 segundos e, após, lavar com água corrente, água amoniacal 2% e água corrente. Desidratar com banhos de álcool absoluto, 4 vezes e após banhos com xilol, 3 vezes.
- 17- Montar a lâmina com bálsamo sintético.

Controle de especificidade:

Controle positivo - utilizado um caso bem estabelecido de mastocitose para o controle positivo durante a realização de todos os passos da técnica.

4.7.4 Análise de Imagem

A contagem do número de mastócitos por área, marcados pelo anticorpo antitriptase, foi feita através de um sistema de análise de imagem de vídeo Image-Pro Plus versão 4.1 (Media Cybernetics, Silver Spring, EUA). Foi utilizado microscópio Zeiss Axiostar com ótica corrigida ao infinito (Zeiss, Oberkochen, Alemanha) e uma objetiva planacromática de 20 aumentos, fornecendo imagens com magnificação final de 200 aumentos e resolução de 1 pixel por micrômetro. As imagens foram digitalizadas através de uma videocâmera Sony DC14 S (Sony Corp., Tóquio, Japão) acoplada a microcomputador

padrão IBM-PC equipado com placa de captura Image Pro Plus Capture Kit de 640 X 480 pixel, cores de 24 bits.

As dimensões do campo foram 320 μm X 240 μm (área de 0,0768 mm^2). A contagem foi realizada de forma interativa através do sistema de análise de imagem com avaliação de número de objetos ajustados à unidade de área (WEIBEL, 1980; GUNDERSEN et al., 1988; HAMILTON, 1995).

A epiderme foi orientada horizontalmente de forma que os campos selecionados pudessem cobrir desde a epiderme até o tecido subcutâneo. Para cada lâmina analisada foram amostrados 10 campos, escolhidos de forma aleatória e de modo que não estivessem sobrepostos. Os dados da contagem de cada campo foram armazenados em planilha Excel para posterior análise.

Cada caso foi identificado unicamente por um número, sendo o diagnóstico desconhecido pelo observador.

As **Figuras 7 e 8** ilustram o sistema de análise de imagem em dois casos distintos.

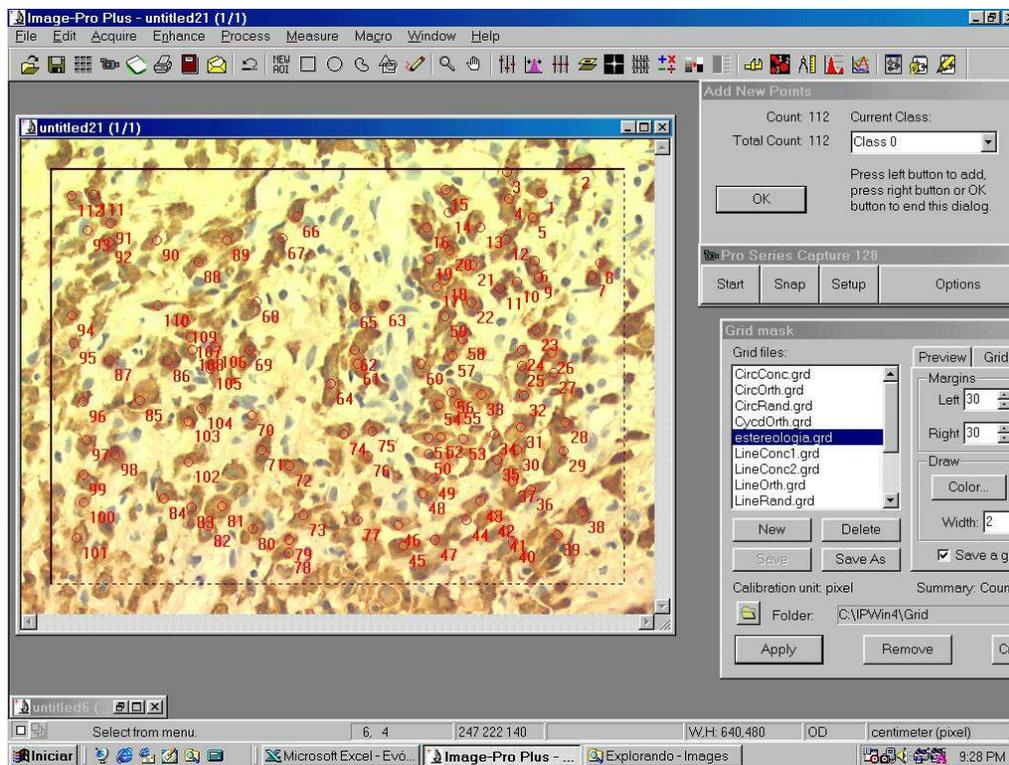


Figura 7 Análise de imagem mostrando a área de contagem e os mastócitos enumerados.

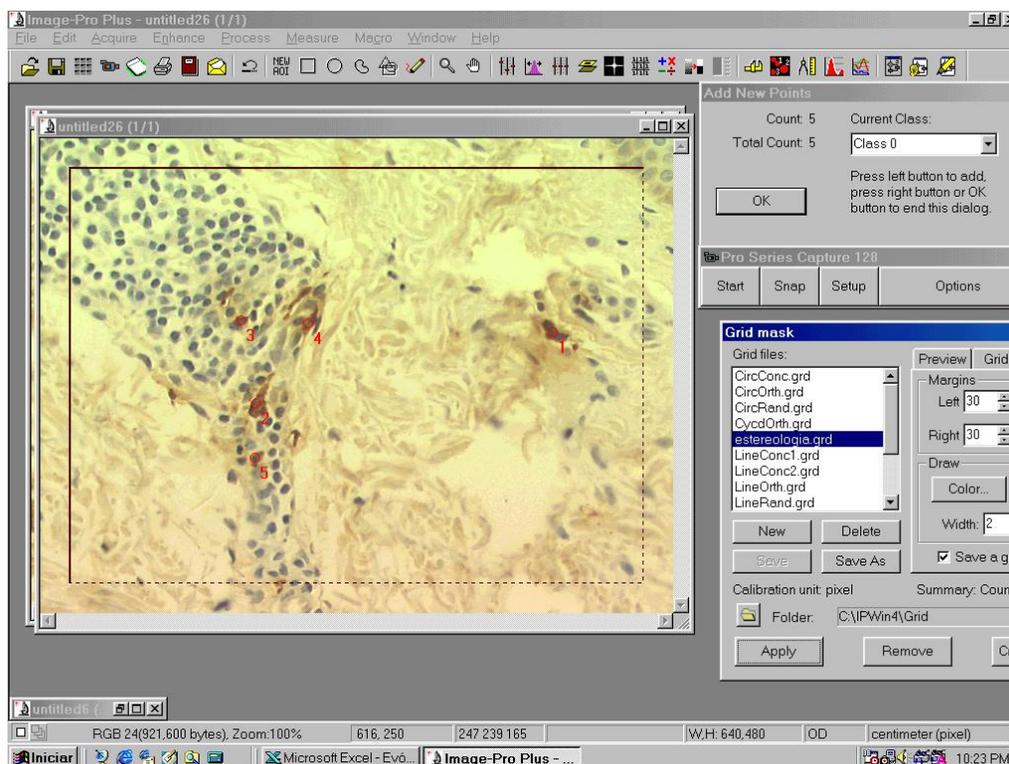


Figura 8 Análise de imagem mostrando a identificação de 5 mastócitos na área assinalada.

4.8 Análise dos Resultados

Foi realizada análise descritiva das características clínicas e dos achados histológicos.

As variáveis que tiveram distribuição simétrica foram apresentadas com a média e o desvio padrão; para aquelas com distribuição assimétrica a mediana e o intervalo interquartil, compreendido entre 25% e 75%. Algumas vezes foram apresentados os dois resultados para comparação e melhor compreensão dos dados.

O teste exato de Fisher foi aplicado para a análise de variáveis qualitativas e com um pequeno número de casos, como a comparação entre a presença de infiltrado mastocitário e a localização deste infiltrado.

Para a comparação das contagens de mastócitos entre o método imuno-histoquímico e o histológico foi utilizado o teste não-paramétrico de Wilcoxon. Além disto aplicou-se o método sugerido por Bland e Altman para a avaliação da concordância entre duas medidas clínicas (BLAND e ALTMAN, 1986). Realizada também regressão linear entre os dois métodos, após transformação logarítmica devido à grande variabilidade dos dados.

As contagens de mastócitos foram comparadas em relação às diferentes formas cutâneas (urticária pigmentosa e mastocitoma), presença ou não de sintomas sistêmicos, infiltrado de mastócitos e agregação nodular do infiltrado, utilizando-se o teste de Mann Whitney (não-paramétrico).

O nível de significância utilizado foi 5%.

5 RESULTADOS

5.1 Características da População

Foram incluídos na amostra um total de 33 crianças, com a idade variando entre 3 meses e 14 anos, no momento do diagnóstico, cujas características gerais e clínicas estão apontadas nos **Anexos 5 e 6**, respectivamente. Vinte e dois pacientes foram provenientes da rede pública de atendimento e 11 de consultórios privados. A **Tabela 5** mostra as principais características dos pacientes incluídos no estudo.

Tabela 5 Características demográficas e clínicas dos 33 pacientes com mastocitose

Característica	Dados
Sexo masculino n (%)	21 (63,6)
Idade da manifestação da mastocitose (em meses)	
Média (desvio padrão)	21,39 (37,57)
Mediana (percentil 25 e 75)	4 (1,0 e 24,0)
Tempo entre a manifestação e o diagnóstico da mastocitose (em meses)	
Média (desvio padrão)	20,60 (34,34)
Mediana (percentil 25 e 75)	7 (5,0 e 14,0)
Manifestação cutânea da mastocitose	
Mastocitoma n (%)	10 (30,3)
Urticária pigmentosa n (%)	21 (63,6)
Mastocitose bolhosa n (%)	2 (6,1)
Mastocitose sistêmica n (%)	6 (18,8)

Sessenta e seis por cento dos pacientes (22 casos) manifestaram os sintomas cutâneos até os 6 meses de idade e 75,8% (25) até os dois anos. Quatro crianças (12,1%) já apresentavam sintomas cutâneos ao nascimento e em 5 eles se manifestaram no primeiro mês de vida. Vinte e quatro diagnósticos (72%) foram realizados até 12 meses após a apresentação inicial dos sintomas.

Todos os pacientes do estudo foram classificados como portadores de mastocitose incipiente (grupo I do Consenso de 1991). Em 14 casos havia registro de resultados de exames, tais como hemograma, transaminases hepáticas, radiografias ósseas, ecografia abdominal, aspirado e biópsia de medula óssea. Seis doentes foram classificados como tendo mastocitose sistêmica pois apresentavam sinais, sintomas ou achados laboratoriais de manifestação sistêmica associados ao comprometimento cutâneo. Em todos estes casos havia o registro de prurido. As principais manifestações identificadas nestes pacientes podem ser vistas na **Tabela 6**.

Tabela 6 Descrição das principais características dos 6 casos de mastocitose sistêmica da amostra

Nº Caso	Idade (em meses)	Manifestação Cutânea	Descrição dos achados
7	2	UP	Hepatomegalia, esplenomegalia e anemia.
11	24	UP	<i>Flushing</i> , dor óssea e osteólise focal nas radiografias, hepatomegalia, esplenomegalia, 30% de mastócitos no aspirado de medula óssea.
13	4	UP	Diarréia, <i>flushing</i> , hepatomegalia, esplenomegalia, adenopatia e linfocitose.
15	6	UP	Cefaléia, esplenomegalia, 5% de mastócitos e presença de eosinófilos no aspirado de medula óssea.
24	4	MB	Diarréia, infiltração de mastócitos na parede do intestino.
27	1	UP	Diarréia, hipotensão, retardo de desenvolvimento neuropsicomotor, hepatomegalia, esplenomegalia, adenopatia e anemia.

UP = urticária pigmentosa MB = mastocitose bolhosa

Prurido foi relatado em 20 casos (62,5%), sendo que destes, 14 (70%) tinham urticária pigmentosa, 5 (25%) mastocitoma e 1 (5%) urticária bolhosa.

As localizações das lesões cutâneas da mastocitose podem ser comparadas na **Tabela 7**.

Tabela 7 Localização e frequência das lesões cutâneas dos 33 casos de mastocitose com idade entre 3 meses e 14 anos

Manifestações cutâneas da mastocitose (n)	Local das lesões	Número de pacientes (%)
Mastocitoma (10)	Tronco	5 (50)
	Membros inferiores	2 (20)
	Membros superiores	1 (10)
	Mais de um local	2 (20)
Urticária pigmentosa (21)	Tronco	3 (14,3)
	Membros inferiores	1 (4,8)
	Membros superiores	-
	Mais de um local	10 (47,6)
	Generalizado	7 (33,3)
Mastocitose bolhosa (2)	Mais de um local	1 (50)
	Generalizado	1 (50)

5.2 Análise Histológica

Em 21 das 33 biópsias foi identificada a infiltração de mastócitos na derme. Em 19 delas, a localização preferencial foi na região perivascular. Em 4 casos, entre os 12, nos quais não havia infiltrado, pôde ser identificada a presença de mastócitos isolados na região perivascular. Portanto, na presença de infiltrado mastocitário, houve uma predominância pela região perivascular ($p=0,001$, teste exato de Fisher) (**Figura 9**). Não houve diferenças

significativas entre a presença de infiltrado mastocitário e as várias formas cutâneas de mastocitose ou a mastocitose sistêmica.

A infiltração de mastócitos esboçava uma agregação nodular em 5 casos (**Figura 10 e 11**). Destes, 4 eram de urticária pigmentosa e 1 de mastocitose bolhosa.

A presença de mastócitos perineurais foi identificada em 2 biópsias, ambas com urticária pigmentosa (**Figura 12 e 13**).

A presença de eosinófilos foi identificada em 15 pacientes (45,5%), sendo que em 10 deles associava-se ao infiltrado perivascular de mastócitos (**Figura 14**).

No **Anexo 7** são descritos detalhadamente os achados histológicos de cada paciente.

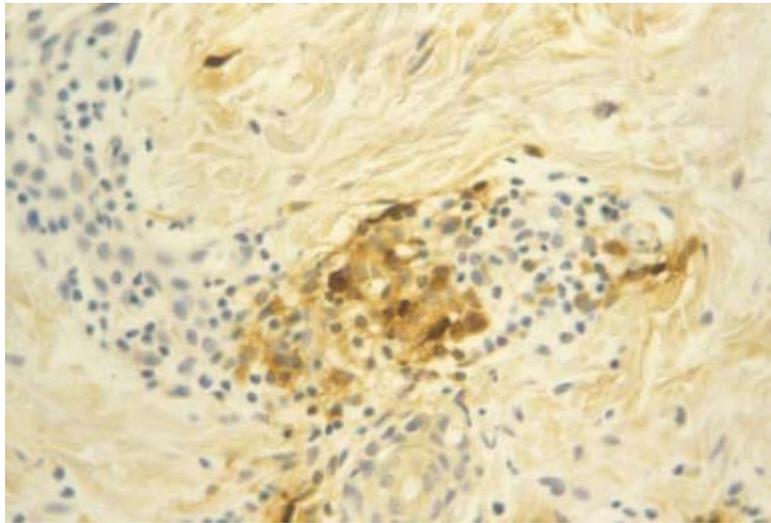


Figura 9 Infiltrado perivascular de mastócitos, marcados com anticorpo antitriptase (imuno-histoquímica estreptavidina-peroxidase), 400X.

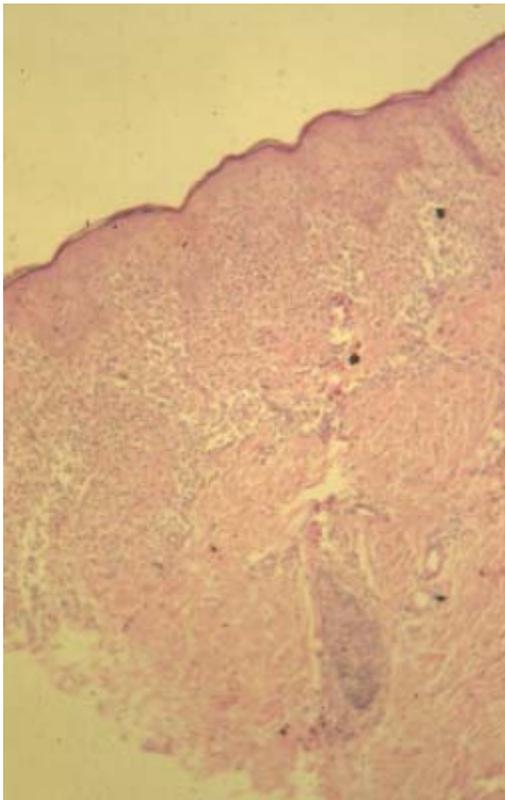


Figura 10 Infiltrado nodular de mastócitos na derme papilar e reticular, coloração por HE, 100X.

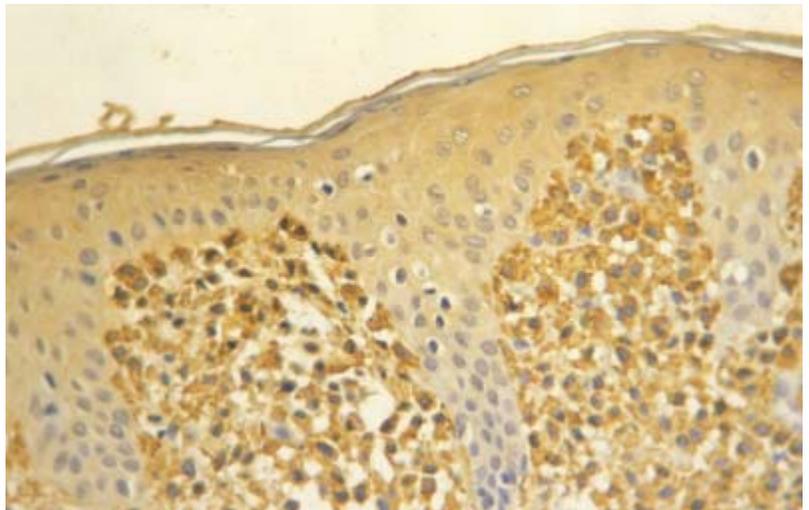


Figura 11 Mesmo caso da figura 10, com infiltrado nodular de mastócitos, marcados com anticorpo antitriptase (imuno-histoquímica estreptavidina-peroxidase), 400X.

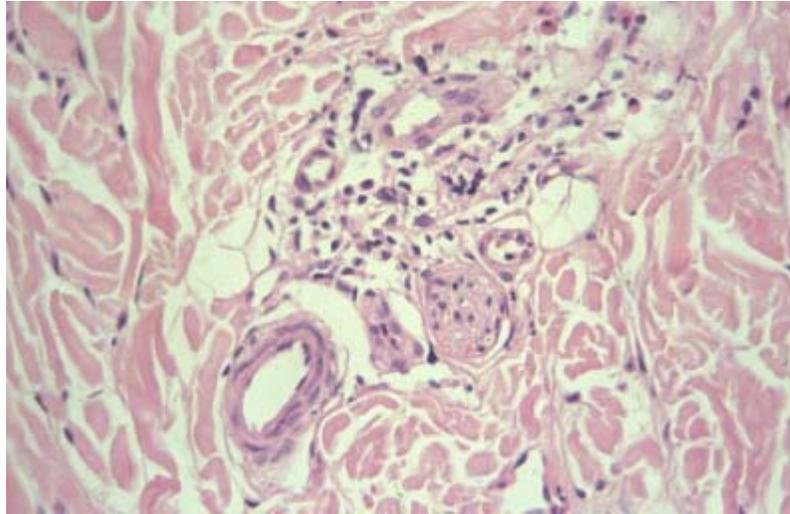


Figura 12 Infiltrado perineural e perivascular de mastócitos, HE, 400X.

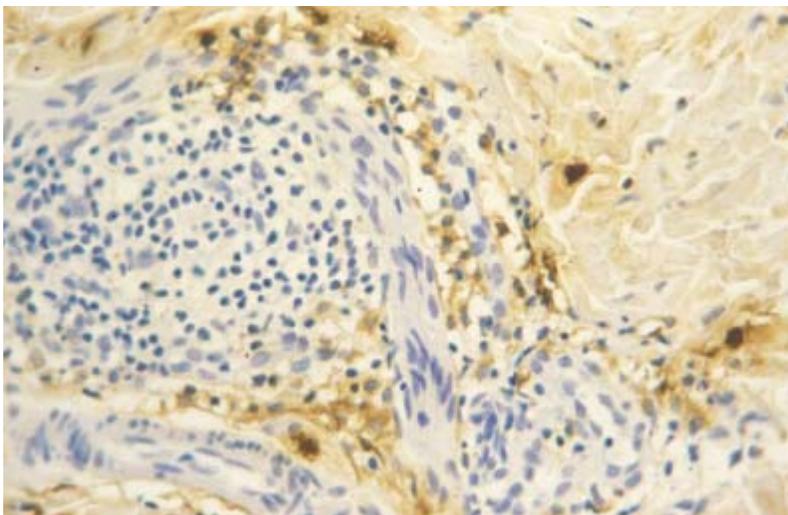


Figura 13 Infiltrado perineural de mastócitos marcados com anticorpo antitriptase (imunohistoquímica estreptavidina-peroxidase), 400X.

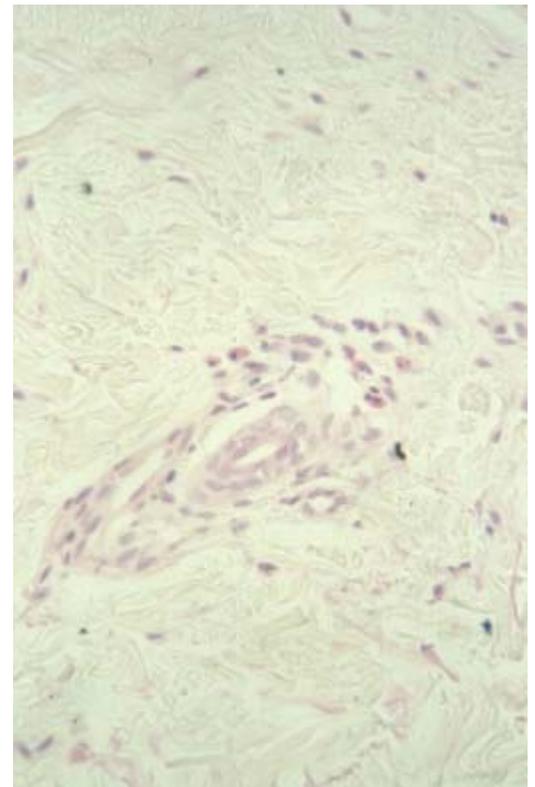


Figura 14 Eosinófilos na região perivascular, HE, 400X.

A média da contagem dos mastócitos por área (densidade de mastócitos) nas diferentes formas de mastocitose cutânea, assim como as medianas, podem ser vistas na **Tabela 8**. Nos casos com mastocitoma a mediana (intervalo interquartilico) foi 23,3 (15,20 e 50,00) mastócitos/mm², naqueles com urticária pigmentosa 75,00 (15,20 e 288,60) mastócitos/mm² e nos com mastocitose bolhosa 451,50 (299,20 e 603,80) mastócitos/mm². Não houve diferença significativa das contagens entre os pacientes com mastocitoma e aqueles com urticária pigmentosa (p=0,4 teste Mann-Whitney).

A média da densidade de mastócitos de todos os casos foi 200,97 (desvio padrão 313,64) células/mm² e a mediana 50,00 (intervalo interquartilico 15,20 e 289,40) células/mm². Não houve diferença nas contagens entre os pacientes com e sem sintomas sistêmicos (p=0,7 teste Mann-Whitney).

5.3 Análise Imuno-histoquímica

Os mastócitos marcados com o anticorpo anti-triptase foram identificados através da coloração acastanhada de seus grânulos citoplasmáticos, como pode ser visto nas **Figuras 9, 11 e 13**.

O resultado da média e mediana da contagem dos mastócitos por área (densidade), marcados pelo anticorpo antitriptase e avaliados através de análise de imagem, pode ser visto na **Tabela 8**. Nos casos com mastocitoma a mediana (intervalo interquartilico) foi 121,74 (84,64 e 273,44) mastócitos/mm², naqueles com urticária pigmentosa 158,85 (74,22 e 373,70) mastócitos/mm² e nos com mastocitose bolhosa 1141,27 (686,20 e 1596,35) mastócitos/mm². Não houve diferença significativa das contagens entre os pacientes com mastocitoma e aqueles com urticária pigmentosa (p=0,6 teste Mann-Whitney).

A média da densidade de mastócitos encontrada nos 33 casos foi 400,96 (desvio padrão 509,82) células/mm² e a mediana 158,85 (intervalo interquartilico 84,64 e 391,93) células/mm².

Tabela 8 Descrição dos valores individuais e estatísticas descritivas das densidades de mastócitos nas análises histológica e imuno-histoquímica em biópsias da pele de pacientes de 3 meses a 14 anos com diferentes formas de mastocitose cutânea

Manifestação cutânea (n)	Análise histológica[#] Densidade de mastócitos[§]	Análise imuno-histoquímica^{##} Densidade de mastócitos[§]	p	
Mastocitoma (10)	11,36	37,76		
	25,38	42,97		
	10,23	84,64		
	31,82	96,35		
	15,91	100,26		
	50,00	143,23		
	15,15	216,15		
	21,21	273,44		
	289,39	734,38		
	378,03	860,68		
Média (desvio padrão)	84,85 (133,31)	258,98 (294,6)	0,005*	
Mediana (percentil 25 e 75)	23,3 (15,20 e 50,00)	121,74 (84,64 e 273,44)		
Urticária pigmentosa (21)	1,52	29,95		
	75,00	39,06		
	18,94	57,29		
	15,15	58,59		
	4,92	71,61		
	384,47	74,22		
	9,47	98,96		
	78,03	108,07		
	33,33	111,98		
	75,76	149,74		
	5,30	158,85		
	58,33	204,43		
	8,33	213,54		
	293,94	266,93		
	48,48	320,31		
	218,18	373,70		
288,64	391,93			
1284,09	761,72			
1143,94	1552,08			
195,45	1597,66			
639,39	1718,75			
Média (desvio padrão)	232,40 (364,72)	398,06 (539,63)	0,01*	
Mediana (percentil 25 e 75)	75,00 (15,20 e 288,60)	158,85 (74,22 e 373,70)		
Mastocitose bolhosa (2)	299,24	686,20		
	603,79	1596,35		
Média (desvio padrão)	451,50 (215,38)	1141,27 (643,57)	NA	
Mediana (percentil 25 e 75)	451,50 (299,20 e 603,80)	1141,27 (686,20 e 1596,35)		
Total (33)			0,0001*	
	Média (desvio padrão)	200,97 (313,64)		400,96 (509,82)
	Mediana (percentil 25 e 75)	50,00 (15,20 e 289,40)		158,85 (84,64 e 391,93)

[#] coloração dos mastócitos com Giemsa e contagem manual

^{##} marcação dos mastócitos com o anticorpo antitriptase e contagem com análise de imagem

[§] número de células/mm²

* teste não-paramétrico de Wilcoxon

NA = não aplicável

As contagens de mastócitos marcados com anticorpo antitriptase nos pacientes com mastocitose sistêmica (mediana: 154,30 células/mm²; percentil 25 e 75: 108,07 e 686,20) não diferiram daquelas dos pacientes sem sintomas sistêmicos (mediana: 208,99 células/mm²; percentil 25 e 75: 74,22 e 391,93) (p=0,8 teste Mann-Whitney).

As contagens de mastócitos marcados com o anticorpo foram significativamente maiores quando havia infiltrado de mastócitos identificado na avaliação histológica (p=0,0079 teste Mann-Whitney). As medianas e os intervalos interquartílicos encontrados na presença e ausência de infiltrado foram 273,44 (111,98 e 761,72) mastócitos/mm² e 91,80 (50,13 e 186,20) mastócitos/mm², respectivamente. Com a presença de infiltrado nodular também houve uma contagem significativamente maior de mastócitos marcados com o anticorpo (p=0,01 teste Mann-Whitney). A mediana (intervalo interquartílico) encontrada quando havia o infiltrado nodular foi 1552,08 (761,72 e 1596,35) células/mm² e na sua ausência 176,49 (72,91 e 296,88) células/mm².

Não houve diferença entre a presença de eosinófilos e a densidade de mastócitos encontrada em qualquer um dos dois métodos utilizados (p>0,05 teste Mann-Whitney).

Comparando-se a contagem dos mastócitos por área (densidade) entre a histologia e a imuno-histoquímica houve uma diferença significativa (p=0,0001 teste não-paramétrico de Wilcoxon). A **Figura 15** mostra as diferenças das densidades de mastócitos entre os métodos (imuno-histoquímica – histologia) contra a média dos dois métodos [(imuno-histoquímica + histologia)/2]. Desta forma pode ser visto que as duas técnicas não concordam entre si, pois as diferenças não estão próximas ao zero. A média da diferença entre as contagens foi 199,98 células/mm² (±365,31 DP). A **Tabela 8** mostra que também não houve semelhança, entre os dois métodos, nos grupos mastocitoma e urticária pigmentosa (p=0,005 e p=0,01, respectivamente, teste não-paramétrico de Wilcoxon).

Em média, puderam ser identificados 518% a mais de mastócitos com a técnica imuno-histoquímica quando comparada com a histológica, com os dados podendo variar entre 80% a menos até 2897% a mais. Em 4 casos houve uma contagem menor com a imuno-histoquímica.

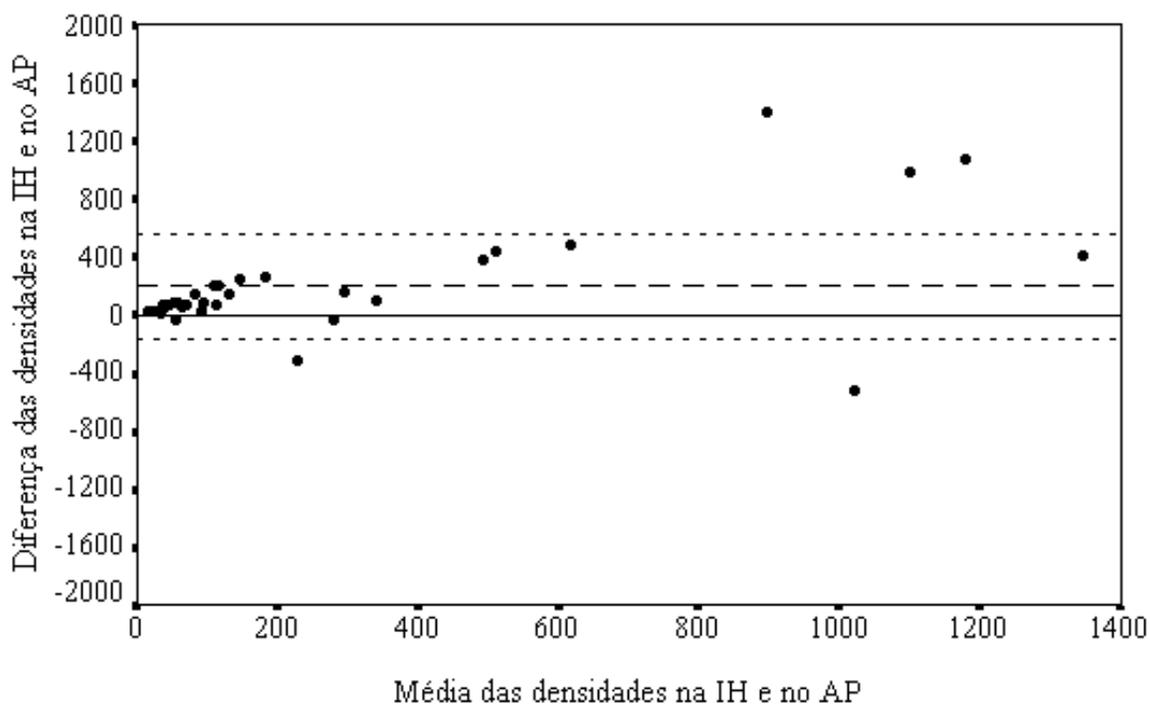


Figura 15 Diferenças entre as densidades de mastócitos entre dois métodos (imuno-histoquímica – histologia) contra a média dos dois métodos $[(\text{imunohistoquímica} + \text{histologia})/2]$. IH = imuno-histoquímica, AP = anátomo-patológico ou histologia.

Incluindo-se todos os pacientes da amostra na regressão linear, a equação encontrada foi: **$\text{Ln da densidade na IH} = 3,1938 + 0,5164 \text{ Ln da densidade no AP}$** .

Na **Figura 16** está a representação da regressão linear, podendo ser identificados os diferentes grupos do estudo.

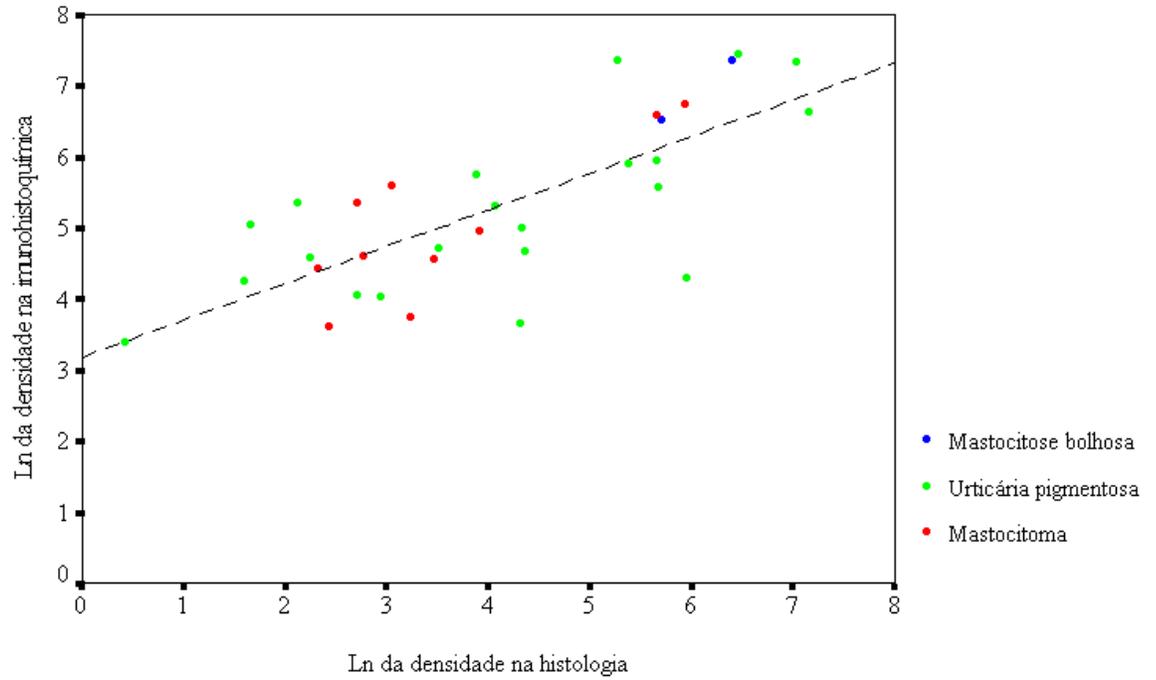


Figura 16 Regressão linear entre os dois métodos (imuno-histoquímica e histologia) após transformação logarítmica das densidades de mastócitos. Ln = logaritmo natural.

6 DISCUSSÃO

6.1 Características da População

O início das manifestações cutâneas da mastocitose pode ocorrer em qualquer idade, porém, é visto em cerca de 55% dos pacientes entre o nascimento e os 2 anos; 10% entre os 2 e 15 anos e os restantes 35% após esta idade, com pequenas variações nestes dados (FINE, 1980; KETTELHUT e METCALFE, 1991; METCALFE, 1991d; METCALFE, 1999; GYSEL e ORANJE, 2000; MIDDELKAMP HUP et al, 2002). Em uma série de 112 pacientes, 75% deles manifestou os sintomas até os dois anos e, deste grupo, 80% até os seis meses de idade (FINE, 1980). As lesões podem, inclusive, estar presentes já ao nascimento, com dados da literatura variando entre 11% e 34% (FINE, 1980; FERNÁNDEZ et al., 1998). Na amostra do estudo aqui realizado, as lesões cutâneas ocorreram ao nascimento em 12% dos casos e também prevaleceu a manifestação precoce dos sintomas, com mais de 75% dos casos iniciando até os dois anos e 88% destes até os seis meses, corroborando assim a idéia de que a mastocitose é uma doença predominantemente da primeira infância.

Apesar de pequenas variações nos dados, não existe preponderância de sexo na mastocitose (FINE, 1980; KETTELHUT e METCALFE, 1991; ALLISON et al., 1997;

METCALFE, 1999; GYSEL e ORANJE, 2000). Em uma série de 172 pacientes, Fernández verificou um discreto predomínio do sexo masculino (1,49:1). Estes dados coincidem com a distribuição dos casos deste estudo quanto ao sexo (1,75 masculino : 1 feminino).

Na infância, entre as expressões cutâneas da mastocitose, a mais comum é a urticária pigmentosa, tendo sido diagnosticada em 63,6% dos casos aqui descritos. Este dado equipara-se com o relatado por outros pesquisadores (STEIN, 1986; LONGLEY et al., 1995; FERNÁNDEZ et al., 1998; KATSAMBAS et al., 1999; GYSEL e ORANJE, 2000). A UP, além de ser a apresentação clínica mais prevalente na infância, usualmente evolui com um bom prognóstico.

Os mastocitomas também são formas freqüentes de mastocitose cutânea, sendo diagnosticados em 30,3% dos pacientes. Fernández descreveu 40,1% entre sua série de 172 pacientes (FERNÁNDEZ et al., 1998). Acredita-se que a prevalência pode ser maior do que a relatada, uma vez que pode não haver uma procura tão grande por atendimento médico, como nos casos da UP, por ser menos extensa, causar menor preocupação aos pais ou, mesmo, não ser percebida.

O termo mastocitose bolhosa, utilizado na classificação da doença cutânea, é uma designação passível de críticas, uma vez que não existe uniformidade na sua descrição, sendo, inclusive, sugerido o seu abandono (FERNÁNDEZ et al., 1998). A presença de lesões bolhosas pode acompanhar diferentes expressões cutâneas da mastocitose, como a urticária pigmentosa e os mastocitomas; ser o equivalente ou a primeira revelação da mastocitose cutânea difusa e até mesmo ser apenas uma manifestação secundária da fragilidade cutânea da pele jovem, pois é vista mais na infância (DIBACCO e DELEO, 1982; SOTER, 1991; FERNÁNDEZ et al., 1998; GREAVES, 1998). Há estudos que descrevem em torno de 5% dos pacientes com UP expressando bolhas ou vesículas (FINE ,

1980). Apesar destas divergências, o termo mastocitose bolhosa foi utilizado no presente estudo, baseando-se no conceito de bolhas como apresentação predominante do quadro cutâneo (MURPHY et al., 1999). Dois pacientes foram classificados desta forma devido à exuberância de bolhas e vesículas e também pela dificuldade de agrupá-los nos outros tipos de mastocitose cutânea.

A incidência de envolvimento sistêmico é difícil de ser avaliada, uma vez que depende da extensão e do rigor da investigação (HORAN e AUSTEN, 1991; GYSEL e ORANJE, 2000). No grupo aqui estudado, 6 pacientes (18,8%) apresentaram pelo menos uma manifestação sistêmica além do comprometimento cutâneo. Para a interpretação destes dados deve ser levado em consideração que este é um estudo retrospectivo e as suas desvantagens são evidentes. Baseando a seleção da maioria dos exames laboratoriais e outras investigações na abordagem individual do paciente, pode-se introduzir uma tendenciosidade na estimativa da incidência de vários achados anormais, na medida em que quanto mais gravemente o paciente é afetado, mais intensa e freqüente será a avaliação do mesmo. Por outro lado, a ausência de um protocolo pré-estabelecido definindo as observações e o intervalo entre elas, modifica a avaliação rotineira de cada paciente e o levantamento posterior das informações, uma vez que elas dependem do registro em local e de forma adequados. Para exemplificar, dos 33 casos estudados, somente em 14 havia o apontamento de exames ou avaliação clínica detalhada, o que pode significar a existência de outros casos de mastocitose sistêmica que não puderam ser identificados nesta série, havendo até a possibilidade de ter ocorrido uma subestimativa de casos mais graves, com comprometimento de outros órgãos além do cutâneo.

Apesar das dificuldades expostas acima, cabe uma comparação dos achados sistêmicos da série com os dados da literatura. As manifestações hematológicas descritas

em pacientes com doença sistêmica de mastócitos abrangem desde as citopenias (anemia, trombocitopenia e leucopenia/granulocitopenia), as citoses (leucocitose/granulocitose, eosinofilia, monocitose, trombocitose e linfocitose) até as doenças mieloproliferativas (HORNY et al., 1990; PARKER, 1991b). Porém, há diferença no comprometimento hematológico quando se comparam pacientes com e sem manifestação cutânea de urticária pigmentosa. Existem evidências de que pacientes adultos com urticária pigmentosa têm risco significativamente menor de doenças mieloproliferativas, mielodisplásicas e leucemia de mastócitos (HORNY et al., 1990). Na infância, a mastocitose dificilmente cursa com transtornos hematológicos (GYSEL e ORANJE, 2000). Essas informações reforçam a baixa prevalência de comprometimento hematológico encontrada na presente série.

As alterações histológicas da medula óssea de crianças com mastocitose cutânea foram avaliadas por Kettelhut et al. A presença de eosinófilos foi um achado freqüente nestes pacientes. O número de mastócitos identificados no aspirado, assim como os pequenos agregados paratrabeculares e perivasculares na biópsia de medula óssea foram semelhantes entre as crianças com mastocitose e as do grupo controle. Não foram identificados infiltrados patológicos de mastócitos, ao contrário daqueles observados em pacientes adultos, com doença sistêmica. Os autores sugerem que nos pacientes pediátricos com mastocitose cutânea, estes agregados perivasculares, contendo mastócitos, poderiam representar um reservatório da proliferação de mastócitos que constitui-se na fonte dos mastócitos cutâneos (KETTELHUT et al., 1989). Já nas crianças com doenças sistêmicas dos mastócitos, comparando-se com os achados em adultos, as lesões focais na medula óssea freqüentemente estão presentes mas são menores e localizadas preferencialmente nas regiões perivasculares, com a presença de linfócitos, eosinófilos e outros elementos mielóides. Os achados no aspirado de medula óssea nas crianças são semelhantes aos dos

adultos, podendo apresentar um aumento no número de mastócitos (PARKER, 1991a). No presente estudo, dos cinco pacientes em que havia o registro da realização de investigação da medula óssea, dois apresentaram aumento no número de mastócitos. Os dois casos tinham urticária pigmentosa como manifestação cutânea e mostravam sintomas sistêmicos da doença. Assim, os achados histológicos provavelmente representam um verdadeiro comprometimento da medula, muito mais do que a proliferação e maturação normais dos mastócitos.

Em crianças, assim como nos adultos, o envolvimento do trato gastrointestinal também é incomum, estimando-se a sua ocorrência em 4% dos doentes (GYSEL e ORANJE, 2000). Diarréia é um dos principais sintomas e está relacionada com má-absorção. Em um dos pacientes, devido à manifestação de diarréia crônica, foi realizada biópsia de intestino que mostrou o comprometimento deste órgão pela infiltração de mastócitos na parede intestinal.

O prurido é relatado na literatura como sendo o principal sintoma e o mais freqüente em crianças com mastocitose, podendo levar a extensas áreas de pele escoriadas (KETTELHUT e METCALFE, 1991; STEIN, 1986). Fine, em 1980, citou uma série de 113 casos de urticária pigmentosa onde 41% manifestavam prurido. Na amostra aqui descrita 62,5% dos pacientes apresentavam prurido e a maioria deles (70%) tinha UP. O prurido, assim como o sinal de Darier, são características adicionais do complexo quadro clínico da mastocitose (SOTER, 1991). Ele tende a ser paroxístico, de leve a moderado, permanecendo nos locais das lesões ou podendo generalizar-se (STEIN, 1986).

6.2 Análise Histológica

Após a descrição dos mastócitos, em 1879, os métodos utilizados para a sua identificação tiveram poucas mudanças, as principais ocorrendo nas últimas duas décadas. O princípio de que compostos básicos formarão ligações iônicas com glicosaminoglicanos sulfatados nos grânulos dos mastócitos, embasa a maioria dos procedimentos de detecção dos mastócitos. A lista dos corantes empregados para evidenciar estas células inclui aqueles que coram metacromaticamente (Giemsa e azul de toluidina) ou ortocromaticamente (“Alcian blue” e safranina) e avidina conjugada a enzimas ou a compostos fluorescentes.

Comum a todas as formas de mastocitose, é a presença de um maior número de mastócitos nos diferentes tecidos. Na pele também ocorre uma infiltração destas células e, apesar das diferentes apresentações clínicas da mastocitose cutânea, o padrão histológico é semelhante. Vários autores consideram que não há diversidades no aspecto histológico dos diferentes tipos da doença e que os resultados das biópsias não ajudam a prever o risco de manifestações sistêmicas (KETTELHUT e METCALFE, 1991; SOTER, 1991; ALLISON et al., 1997; GREAVES, 1998).

Os mastócitos, nas biópsias de lesões cutâneas de mastocitose, podem estar presentes em pequeno número, dispersos ou com disposição perivascular na derme ou como infiltrações maciças com formação de agregados nodulares e tendência à obliteração da arquitetura cutânea. A localização predominante é o terço superior da derme, justamente na proximidade da junção dermo-epidérmica, com disposição perivascular. Nos achados histológicos do presente estudo também houve predominância significativa do infiltrado mastocitário nas regiões perivasculares. Não puderam ser identificados padrões histológicos diferentes entre os casos de urticária pigmentosa e os de mastocitoma, bem como entre

aqueles com e sem sintomas sistêmicos. Contudo, o pequeno número de pacientes com mastocitose bolhosa não permitiu a análise conclusiva neste aspecto.

Ocasionalmente, os agregados nodulares de mastócitos podem estender-se para porções mais profundas da derme, atingindo, inclusive, a gordura subcutânea (DIBACCO e DELEO, 1982; STEIN, 1986). No estudo, 5 casos esboçavam agregação nodular de mastócitos, sendo 4 com manifestação de urticária pigmentosa e 1 com mastocitose bolhosa, reforçando a falta de um padrão histológico para as diferentes formas de apresentações cutâneas da doença.

Em dois casos do estudo foram identificados mastócitos nas regiões perineurais, sendo esta também uma localização descrita na literatura mas pouco destacada (SCHNEIDER e SCHWARTZ, 1997; EADY et al., 1998; GYSEL e ORANJE, 2000). Acredita-se que esta disposição esteja relacionada com a interação dos mastócitos com a rede neural, capaz de influenciar respostas imunes e inflamatórias, através da liberação de neurotransmissores (SONTHEIMER e THARP, 1993; LOVEREN et al., 1997).

Eosinófilos podem estar presentes e dispersos dentro do infiltrado (DIBACCO e DELEO, 1982). Estas células são recrutadas e ativadas nos tecidos pela interleucina 3 em sinergia com outros mediadores gerados pelos mastócitos, fazendo parte da complexa resposta inflamatória (SONTHEIMER e THARP, 1993; DELVES e ROITT, 2000b). Pôde ser identificada a presença de eosinófilos em 15 dos 33 pacientes avaliados e em 10 destes eles estavam associados ao infiltrado perivascular de mastócitos.

As diferenças na efetividade dos procedimentos para coloração dos mastócitos têm levado à heterogeneidade de resultados na investigação destas células. Nenhum deles é completamente específico para mastócitos e a maioria não é apropriado para o uso com os fixadores normalmente utilizados (WALLS et al., 1990). A observação de que a fixação em

formaldeído pode reduzir marcadamente a coloração de mastócitos é bem conhecida e a demonstração deste efeito tem auxiliado na justificativa das discrepâncias nas contagens de mastócitos entre diferentes pesquisas (WALLS et al., 1990).

Cabe salientar que não pôde ser encontrada na literatura nenhuma referência com relação ao número (20 mastócitos por campo de grande aumento) usualmente utilizado como critério para o diagnóstico de mastocitose. Além da falta de respaldo científico para este número, a própria unidade utilizada (campos de grande aumento) é sujeita a críticas, pois estes campos abrangem áreas diferentes de acordo com os microscópios utilizados. Portanto, a contagem deveria ser expressa em quantidade de células por área, que é uma medida mais precisa e reprodutível.

No presente estudo, o número mediano de mastócitos corados por Giemsa nos 33 pacientes de mastocitose cutânea foi 50 células/mm², com 50% dos casos variando entre 15 e 289 células/mm², observando-se um resultado maior do que o normalmente considerado. Estes dados servem como parâmetro de comparação para a outra técnica utilizada no estudo, por ser a reprodução do método empregado rotineiramente nos laboratórios de anatomia patológica para a avaliação destes casos.

6.3 Análise Imuno-histoquímica

Há poucos anticorpos monoclonais específicos para mastócitos. Rimmer et al., em 1984, utilizaram um painel com sete anticorpos monoclonais que reagiram com componentes granulares dos mastócitos. O estudo mostrou o potencial de anticorpos monoclonais como ferramenta para identificar e enumerar infiltrados mastocitários nos

tecidos, porém, nenhum deles marcou em tecidos fixados por outros métodos além da acetona (RIMMER et al., 1984).

O primeiro anticorpo monoclonal específico para um componente definido de mastócitos foi desenvolvido em 1985. Este anticorpo, contra triptase humana de mastócito, uma enzima triptica presente nos grânulos, foi usado para detectar mastócitos no pulmão, no cólon e na pele (WALLS et al., 1990). Em 1990, Walls et al. relataram o uso de três anticorpos monoclonais específicos para triptase, AA1, AA3 e AA5, utilizando uma técnica de imunoperoxidase com avidina-biotina. A amostra cutânea do estudo foi a pele de prepúcio de três crianças circuncidadas. Com o anticorpo AA1, não houve coloração de fundo do colágeno do tecido conjuntivo, tendo sido inteiramente específico para mastócitos. Comparado com o procedimento de coloração azul de toluidina, o método imunoperoxidase com AA1 resultou em coloração mais intensa, e permitiu a identificação de cerca de 200% a mais de mastócitos nos tecidos fixados em formaldeído. Os autores concluíram que a coloração com imunoperoxidase utilizando anticorpo monoclonal AA1 antitriptase é um método sensível e altamente específico para identificar mastócitos nos tecidos embebidos em parafina. Pelo fato do procedimento poder ser aplicado em tecido fixado em formaldeído, esta técnica também oferece vantagens adicionais sobre todas as outras em uso ou experimentais para a detecção de mastócitos (CRAIG et al., 1986; WALLS et al., 1990, HORNY et al., 1993; HAMANN et al., 1995b, PEC et al., 1998; FACCHETTI et al., 1999).

Em 1998, Beer et al., com o objetivo de investigar o papel dos mastócitos nas cicatrizes cirúrgicas patológicas, através da sua identificação e quantificação, utilizaram a técnica imuno-histoquímica com estreptavidina-biotina e anticorpo AA1 para triptase. Os autores reafirmam a idéia que o anticorpo monoclonal AA1 é específico para triptase,

facilitando a identificação dos mastócitos na pele e os locais recentes de degranulação, sendo mais sensível e específico do que a coloração por azul de toluidina (BEER et al., 1998). Baseando-se nestes dados, optou-se pela identificação dos mastócitos com este anticorpo no estudo aqui descrito.

Além da necessidade de técnicas mais específicas para a identificação dos mastócitos, também é necessária a sua correta contagem. É de importância que esta enumeração seja independente de subjetividade, pois somente desta forma se conseguirá fazer comparações entre diferentes estudos, com relação às variadas apresentações clínicas da mastocitose, nos diversos grupos etários e até mesmo a confrontação com outras doenças onde os mastócitos possam estar implicados na patogênese.

Eady, em 1979, determinou a densidade de mastócitos na pele humana normal obtida de biópsias sem anestesia local. Os mastócitos foram contados com uma ocular quadriculada, para que as células não fossem consideradas mais do que uma vez. O valor médio final do número de mastócitos por mm^2 foi derivado de oito avaliações separadas e os mastócitos foram identificados por suas características histológicas. Estas células ocorreram em todos os níveis da derme e do tecido subcutâneo, sendo mais frequentes na derme papilar e subpapilar e com tendência ao agrupamento ao redor de vasos, nervos e apêndices. O número médio de mastócitos por mm^2 no braço foi de 47,96 e no antebraço 50,09. Os autores salientam que o uso de cortes semi-finos, como os utilizados no estudo, teria várias vantagens sobre as técnicas convencionais incluindo maior resolução e imagem em um plano focal único; porém, desde que foram contadas todas as células, algumas delas, cortadas tangencialmente, poderiam ter sido consideradas mais do que uma vez e desta forma superestimado o resultado final (EADY et al., 1979).

Com o objetivo de determinar com maior exatidão a distribuição dos mastócitos na pele normal adulta, Cowen, num estudo publicado em 1979, utilizou associadamente uma estratégia de mapeamento da derme. Os resultados mostraram uma distribuição de mastócitos semelhante entre braço e antebraço, com maior densidade imediatamente abaixo da junção dermoepidérmica, diminuindo gradualmente em direção à derme profunda. A média da densidade dos mastócitos no braço, descrita por estes autores, foi 83,3 células por mm^2 . Observa-se que, os estudos de Eady e colaboradores e Cowen e colaboradores, apesar de utilizarem as mesmas amostras de biópsia de pele, obtiveram contagens de mastócitos diferentes. Os números encontrados servem de exemplo para a alta chance de variabilidade na contagem de mastócitos de acordo com as diversas técnicas empregadas.

Kasper e Tharp compararam a contagem de mastócitos em biópsias da pele normal (obtidas com e sem anestesia local) de dois pacientes com mastocitose. O referido estudo não é claro quanto à técnica empregada, mas permitiu identificar que os mastócitos da pele normal ocuparam uma porcentagem relativamente pequena do volume dérmico (0,4%), diferentemente dos casos de mastocitose maculosa (2,5%) e nodular (64,3%). Entre outros resultados, não houve diferença entre a densidade celular nas biópsias realizadas com ou sem anestesia (KASPER e THARP, 1987).

Em 1988, Garriga et al. determinaram o número de mastócitos na pele de 9 pessoas hígdas, 6 pacientes com urticária pigmentosa e 14 com mastocitose sistêmica. A amostra incluiu apenas adultos. Os mastócitos foram identificados com a coloração azul de toluidina e contados através de ocular quadriculada. Na pele normal foram identificados, em média, 38,4 (± 4 DP) mastócitos/ mm^2 , nos pacientes com urticária pigmentosa 596,5 (± 278 DP) mastócitos/ mm^2 e naqueles com mastocitose sistêmica 720,6 (± 176 DP) mastócitos/ mm^2 . Pacientes com urticária pigmentosa e mastocitose sistêmica também tiveram um aumento

do número de mastócitos na pele perilesional (168,0 e 184,4 mastócitos/ mm², respectivamente) quando comparada com pele normal. Esta observação histológica serve de evidência do aumento no número de mastócitos nos pacientes com mastocitose, confirmando a impressão clínica da doença. Entretanto, reforça a idéia de que somente pela contagem celular não é possível diagnosticar a mastocitose sistêmica (GARRIGA et al., 1988).

Recentemente, Jiang et al. revisaram biópsias da pele de pacientes com e sem psoríase, com o objetivo de quantificar os mastócitos e a expressão de interleucina-8. Para a avaliação dos mastócitos utilizaram técnica imuno-histoquímica com o anticorpo antitriptase. A contagem foi realizada através de uma ocular quadriculada. A densidade de mastócitos encontrada no grupo controle (8 pessoas híginas) foi 47,5 ($\pm 32,5$ DP) mastócitos/mm² (JIANG et al., 2001).

Após a análise dos dados disponíveis na literatura, pode-se estimar que o número de mastócitos por milímetro quadrado na pele normal de pacientes adultos encontra-se entre valores de 38,4 a 83,3, com a variabilidade provavelmente relacionada aos diferentes métodos para a identificação e a contagem dos mesmos. Cabe ressaltar que não se conseguiu dados de literatura do número de mastócitos na pele de crianças híginas para que seja feita a comparação com os resultados do presente estudo.

A análise de imagem começa a ser utilizada na pesquisa, de forma mais constante, devido à necessidade de avaliações mais precisas e com o mínimo de interferência do observador, para torná-las objetivas e comparáveis (SILVA, 1995; HAMILTON, 1995; GUNDERSEN et al., 1988). Porém, ainda são poucos os relatos do seu uso, principalmente na área da dermatologia (HART et al., 2000).

O estudo aqui exposto é um dos poucos que realizou contagem de mastócitos através de análise digital, sendo o único que utilizou biópsias cutâneas de crianças com mastocitose e marcou estas células com anticorpo antitriptase. O número mediano de mastócitos em biópsia de pele das 33 crianças com diagnóstico clínico de mastocitose, foi 159 células/mm², com 50% dos casos variando entre 85 e 392 células/mm². A densidade de mastócitos, utilizando-se a mesma técnica, para os 10 casos de mastocitoma foi 122 células/mm² (intervalo interquartilico 85 e 273 células/mm²) e os 21 com urticária pigmentosa, 159 células/mm² (intervalo interquartilico 74 e 374 células/mm²). Não foi possível definir os dados para os pacientes com mastocitose bolhosa devido ao pequeno número de pacientes incluídos na amostra (2 casos).

Não se conseguiu demonstrar uma relação entre a presença de sintomas sistêmicos associados ao quadro cutâneo e um maior número de mastócitos nas biópsias. Este achado está de acordo com o de outros pesquisadores (GARRIGA et al., 1988). Portanto, o número de mastócitos não parece ser adequado para predizer a extensão da doença e, conseqüentemente, o seu prognóstico. É muito provável que a quantidade dos mastócitos, como dado isolado, não reflita a atividade destas células ou a sua interferência sobre a evolução ou gravidade da doença, sendo muito mais um critério diagnóstico.

As diferenças significativas encontradas na contagem de mastócitos com o método imuno-histoquímico, na presença de infiltrado difuso e infiltrado nodular eram dados já esperados e que correlacionam uma avaliação qualitativa do método histológico com a quantitativa do outro método empregado.

Comparando-se os resultados da imuno-histoquímica associada à análise digital com a técnica utilizada rotineiramente na avaliação destes pacientes (coloração por Giemsa e contagem manual), é significativa a diferença encontrada no número destas células. A

média da diferença entre as contagens foi cerca de 200 mastócitos/mm², sendo superior a primeira. Pôde-se identificar 518% a mais de mastócitos com a técnica imuno-histoquímica quando comparada com a histológica. Todos os casos, com um pequeno número de mastócitos na análise histológica, mostraram um número maior de células na análise imuno-histoquímica, o que torna esta última técnica um recurso precioso, justamente para os casos que possam gerar dúvida de diagnóstico no exame de rotina, com implicações na terapêutica e prognóstico destes pacientes.

A regressão linear empregada mostrou que a relação entre as duas diferentes técnicas é suficientemente boa para, com o dado histológico, permitir predizer qual será o valor aproximado na imuno-histoquímica. As biópsias de mastocitoma foram as que mostraram uma melhor correlação entre as duas técnicas, como ilustra a **Figura 16**.

O estudo, com uma boa amostra para a pouca frequência da doença, demonstra que, com a utilização do anticorpo específico para mastócitos e uma contagem objetiva, há uma diferença significativa das contagens realizadas com técnicas rotineiras. Foi possível definir densidades de mastócitos para mastocitoma e urticária pigmentosa, porém faltam dados na literatura para a comparação destes resultados, inclusive com pele normal, uma vez que a técnica empregada utilizou de forma inédita a marcação com o anticorpo antitriptase associadamente a contagens através de análise digital. Estes resultados são importantes para posteriores comparações e mostram a utilidade da técnica aqui empregada, um recurso precioso, principalmente para os casos duvidosos, com a identificação de pequeno número de mastócitos, após a realização dos métodos rotineiros. Isto implica em diagnósticos mais precisos e, conseqüentemente, tratamentos adequados e melhor qualidade de vida para estas crianças.

Considerando a importância do mastócito como célula produtora de citocinas e sua complexa interação no mecanismo imune cutâneo, que só há pouco tempo começou a ser esclarecida, reveste-se da maior necessidade ainda a definição de técnicas mais precisas para sua identificação. Resultados consistentes servirão de fundamento para pesquisas posteriores, inclusive a nível de fisiologia celular e biologia molecular. Esclarecimentos sobre número absoluto e disposição dos mastócitos nos tecidos, acrescidos de elucidação sobre função e concentração tecidual dos seus produtos, servirão de luz na discussão com relação às variações clínicas de apresentação, evolução e prognóstico da doença, especialmente nas diversidades entre adultos e crianças. Comparações das características imunológicas entre diferentes aspectos da mastocitose são desejáveis e podem conduzir a terapêuticas imunomoduladores que modifiquem o curso da doença.

7 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo permitem concluir que:

As características clínicas da série, com relação a sexo, idade de manifestação dos sintomas e apresentação cutânea da doença, foram comparáveis aos dados da literatura.

A localização preferencial da infiltração de mastócitos é dérmica e perivascular, não sendo possível identificar diferenças histológicas entre as formas mais freqüentes da mastocitose cutânea: urticária pigmentosa e mastocitoma.

O número de mastócitos por milímetro quadrado, corados por Giemsa e contados manualmente, foi semelhante entre os casos de urticária pigmentosa e mastocitoma, não podendo ser este valor considerado como um critério de diferenciação entre as duas formas de mastocitose cutânea.

O número de mastócitos por milímetro quadrado, corados por Giemsa e contados manualmente, foi semelhante entre os casos de mastocitose cutânea com e sem sintomas sistêmicos associados.

O número mediano de mastócitos marcados com o anticorpo monoclonal antitriptase através de técnica imuno-histoquímica e contados com análise digital de imagem, em biópsia de pele de crianças com diagnóstico clínico de mastocitose, foi 159

células por milímetro quadrado. As contagens foram semelhante tanto entre os casos de urticária pigmentosa e mastocitoma quanto entre aqueles com mastocitose cutânea com e sem sintomas sistêmicos associados.

A densidade de mastócitos com a técnica imuno-histoquímica e a contagem através de análise de imagem foi significativamente maior quando comparada com a técnica empregada rotineiramente com a coloração através de Giemsa e a contagem manual. A diferença média entre os dois métodos foi de 200 células por milímetro quadrado.

A densidade de mastócitos com a técnica imuno-histoquímica e a contagem através de análise de imagem foi significativamente maior tanto nos casos com urticária pigmentosa quanto nos com mastocitoma, quando comparada com a técnica empregada rotineiramente com a coloração através de Giemsa e a contagem manual.

Com a técnica imuno-histoquímica e a contagem através de análise de imagem foi possível identificar cerca de 518% a mais de mastócitos quando comparada com a técnica histológica. Portanto, esta técnica poderá ser empregada, especialmente, naqueles casos com um pequeno número de mastócitos identificados na avaliação histológica e que representam dificuldade no diagnóstico de mastocitose.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Allison MA, Schmidt CP. Urticaria pigmentosa. *Int J Dermatol* 1997;36:321-5.
2. Arber DA, Tamayo R, Weiss LM. Paraffin section detection of the *c-kit* gene product (CD117) in human tissues: value in the diagnosis of mast cell disorders. *Hum Pathol* 1998;28:498-504.
3. Bakos L, Storck R, Netto ES. Congenital macular urticaria pigmentosa complicated by massive nodular mastocytosis with systemic involvement. *Br J Dermatol* 1972;87:635-41.
4. Beer TW, Baldwin H, West L, Gallagher PJ, Wright DH. Mast cells in pathological and surgical scars. *Br J Ophthalmol* 1998;82:691-4.
5. Bingham III CO, Austen KF. The molecular and cellular biology of the mast cell. In: Freedberg IM, Eisen AZ, Wolff K, Austen KF, Goldsmith LA, Katz SI, Fitzpatrick TB, editors. *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine*. 5th ed. Mc Graw Hill;1999. p.414-22.
6. Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* 1986;1:307-10.
7. Chang A, Tung RC, Schlesinger T, Bergfeld WF, Dijkstra J, Kahn TA. Familial cutaneous mastocytosis. *Pediatr Dermatol* 2001;18:271-6.

8. Cowen T, Trigg P, Eady RAJ. Distribution of mast cells in human dermis: development of a mapping technique. *Br J Dermatol* 1979;100:635-40.
9. Craig SS, DeBlois G, Schwartz LB. Mast cells in human keloid, small intestine, and lung by an immunoperoxidase technique using a murine monoclonal antibody against tryptase. *Am J Pathol* 1986;124:427-35.
10. Czarnetzki BM, Kolde G, Schoemann A, Urbanitz S, Urbanitz D. Bone marrow findings in adult patients with urticaria pigmentosa. *J Am Acad Dermatol* 1988;18:45-51.
11. Delaporte E, Piérard E, Wolthers BG, Desreumaux P, Janin A, Cortot A, et al. Interferon- α in combination with corticosteroids improves systemic mast cell disease. *Br J Dermatol*;1995;132:479-82.
12. Delves PJ, Roitt IM. The immune System – First of two parts. *NEJM* 2000a;343:37-49.
13. Delves PJ, Roitt IM. The immune System – Second of two parts. *NEJM* 2000b;343:108-17.
14. DiBacco RS, DeLeo VA. Mastocytosis and the mast cell. *J Am Acad Dermatol* 1982;7:709-92.
15. Eady RAJ, Cowen T, Marshall TF, Plummer V, Greaves MW. Mast cell population density, blood vessel density and histamine content in normal human skin. *Br J Dermatol* 1979;100:623-33.
16. Eady RAJ, Leigh IM, Pope FM. Anatomy and organization of human skin. In: Champion RH, Burton JL, Burns DA, Breathnach SM, editors. *Textbook of Dermatology*. 6th ed. Blackwell Science;1998. p.37-111.
17. Facchetti F, Chan JKC, Zhang W, Tironi A, Chilosi M, Parolini S, et al. Linker for activation of T cells (LAT), a novel immunohistochemical marker for T cells, NK cells,

- mast cells, and megakaryocytes. Evaluation in normal and pathological conditions. *Am J Pathol* 1999;154:1037-46.
18. Fernández AT, Campoamor LN, Mora LE, Zambrano AZ. Diagnóstico, tratamiento y clasificación de la mastocitosis pediátrica. Estudio de 172 casos. *Actas Dermosifiliogr* 1998;89:461-76.
 19. Fine JD. Mastocytosis. *Int J Dermatol* 1980;19:117-23.
 20. Finotto S, Mekori YA, Metcalfe DD. Glucocorticoids decrease tissue mast cell number by reducing production of the *c-kit* ligand, stem-cell factor, by resident cells: in vitro and in vivo evidence in murine system. *J Clin Invest* 1997;99:1721-28.
 21. Galli SJ. New concepts about the mast cells. *N Engl J Med* 1993;328:257-65.
 22. Garriga MM, Friedman MM, Metcalfe DD. A survey of the number e distribution of mast cells in the skin of patients with mast cell disorders. *J Allergy Clin Immunol* 1988;82:425-32.
 23. Greaves MW. Mastocytoses. In: Champion RH, Burton JL, Burns DA, Breathnach SM, editors. *Textbook of Dermatology*. 6th ed. Blackwell Science;1998. p.2337-46.
 24. Güler E, Emir S, Kutluk T, Varan A, Büyükpamukçu M. Urticaria pigmentosa associated with Wilms tumor. *Pediatr Dermatol* 2001;18:313-5.
 25. Gundersen HJG, Bendtsen TF, Korbo L, Marcussen N, Møller A, Nielsen K, et al. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS* 1988;96:379-94.
 26. Gysel DV, Oranje AP, Vermeiden I, Raadt JL, Hulder PGH, van Toorenebergen AW. Value of urinary *N*-methylhistamine measurements in childhood mastocytosis. *J Am Acad Dermatol* 1996;35:556-8.

27. Gysel DV, Oranje AP. Mastocytosis. In: Harper J, Oranje A, Prose N, editors. Textbook of Pediatric Dermatology. 1st ed. Blackwell Science;2000. p.600-9.
28. Hamann K, Haas N, Grabbe J, Czarnetzki BM. Expression of stem cell factor in cutaneous mastocytosis. *Br J Dermatol* 1995a;133:203-8.
29. Hamann K, Haas N, Grabbe J, Welker P, Czarnetzki BM. Two novel mast cell phenotypic markers, monoclonal Ki-MC1 and Ki-M1P, identify distinct mast cell subtypes. *Br J Dermatol* 1995b;133:547-52.
30. Hamilton PW. Stereology. In: Hamilton PW, Allen DC editors. Quantitative Clinical Pathology. 1st ed. Blackwell Science;1995. p.3-15.
31. Hart PH, Grimbaldston MA, Jaksic A, Tan JE, Swift GJ, Hosszu Ek, et al. Ultraviolet B-induced suppression of immune responses in interleukin-4 / mice: relationship to dermal mast cells. *J Invest Dermatol* 2000; 114:508-13.
32. Horan RF, Austen KF. Systemic mastocytosis: retrospective review of a decade's clinical experience at the Brigham and Women's Hospital. *J Invest Dermatol* 1991;96:5S-14S.
33. Horny HP, Kaiserling E. Lymphoid cells and tissue mast cells of bone marrow lesions in systemic mastocytosis: a histological and immunohistological study. *Br J Haematol* 1988;69:449-55.
34. Horny HP, Parwaresch MR, Kaiserling E, Müller K, Olbermann M, Mainzer K, et al. Mast cell sarcoma of the larynx. *J Clin Pathol* 1986;39:596-602.
35. Horny HP, Ruck M, Wehrmann M, Kaiserling E. Blood findings in generalized mastocytosis: evidence of frequent simultaneous occurrence of myeloproliferative disorders. *Br J Hematol* 1990;76:186-93.

36. Horny HP, Schumacher U, McCullagh P, Wehrmann M, Roche WR, Kaiserling E. Proliferation of reactive and neoplastic human tissue mast cells. An immunohistochemical study using the antibody PC10 (anti-PCNA). *J Pathol* 1993;170:265-70.
37. Jiang WY, Chattedee AD, Raychaudhuri SP, Raychaudhuri SK, Farber EM. Mast cell density and IL-8 expression in nonlesional and lesional psoriatic skin. *Int J Dermatol* 2001;40:699-703.
38. Kasper CS, Tharp MD. Quantification of cutaneous mast cells using morphometric counting and a conjugated avidin stain. *J Am Acad Dermatol* 1987;16:326.
39. Katsambas AD, Karpouziz AJ, Koumantaki-Mathioudaki E, Jorizzo JL. Mastocytosis with skin manifestations: current status. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 1999;13:155-65.
40. Kettelhut BV, Metcalfe DD. Pediatric mastocytosis. *J Invest Dermatol* 1991;96:15S-18S.
41. Kettelhut BV, Metcalfe DD. Plasma histamine concentrations in evaluation of pediatric mastocytosis. *J Pediatr* 1987;111:419-21.
42. Kettelhut BV, Parker RI, Travis WD, Metcalfe DD. Hematopathology of the bone marrow in pediatric cutaneous mastocytosis. *Am J Clin Pathol* 1989;91:558-62.
43. Leaf FA, Jaecks EP, Rodriguez DR. Bullous urticaria pigmentosa. *Cutis* 1996;58:358-60.
44. Longley BJ, Morganroth GS, Tyrrell L, Ding TG, Anderson DM, Williams DE, et al. Altered metabolism of mast-cell growth factor (*c-kit* ligand) in cutaneous mastocytosis. *N Engl J Med* 1993;328:1302-7.

45. Longley J, Duffy TP, Kohn S. The mast cell and mast cell disease. *J Am Acad Dermatol* 1995;32:546-61.
46. Loubeyres S, Léaute-Labrèze C, Roul S, Labbé L, Bioulac-Sage P, Taieb A. Classification et prise en charge des mastocytoses de l'enfant. *Ann Dermatol Venereol* 1999;126:20-5.
47. Loveren HV, Redegeld F, Matsuda H, Buckely T, Teppema JS Garssen J. Mast cells. In: Bos JD, editor. *Skin immune system (SIS) – Cutaneous immunology and clinical immunodermatology*. 2nd ed. New York: CRC; 1997. p.159-84.
48. Metcalfe DD. Classification and diagnosis of mastocytosis: current status. *J Invest Dermatol* 1991a;96:2S-4S.
49. Metcalfe DD. Clinical Advances in Mastocytosis: An Interdisciplinary Roundtable Discussion – Conclusions. *J Invest Dermatol* 1991b;96:64S-5S.
50. Metcalfe DD. The liver, spleen, and lymph nodes in mastocytosis. *J Invest Dermatol* 1991c;96:45S-6S.
51. Metcalfe DD. The mastocytosis syndrome. In: Freedberg IM, Eisen AZ, Wolff K, Austen KF, Goldsmith LA, Katz SI, Fitzpatrick TB, editors. *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine*. 5th ed. Mc Graw Hill;1999. p.1902-8.
52. Metcalfe DD. The treatment of mastocytosis: an overview. *J Invest Dermatol* 1991d;96:55S-9S.
53. Middelkamp Hup MA, Heide R, Mulder PGH, Oranje AP. Comparison of mastocytosis with onset in children and adults. *JEADV* 2002;16:115-20.
54. Murphy M, Walsh D, Drumm B, Watson R. Bullous mastocytosis: a fatal outcome. *Pediatr Dermatol* 1999;16:452-5.

55. Nagata H, Okada T, Worobec A, Semere T, Metcalfe DD. *C-kit* mutation in a population of patients with mastocytosis. *Int Arch Allergy Immunol* 1997;113:184-6.
56. Nagata H, Worobec AS, Oh CK, Chowdhury BA, Tannenbaum S, Suzuki Y, Metcalfe DD. Identification of a point mutation in the catalytic domain of the proto-oncogene *c-kit* in the peripheral blood mononuclear cells of patients with mastocytosis. *Proc Natl Acad Sci* 1995;92:10560.
57. Parker RI. Hematologic aspects of mastocytosis: I: bone marrow pathology in adult and pediatric systemic mast cell disease. *J Invest Dermatol* 1991a;96:47S-51S.
58. Parker RI. Hematologic aspects of mastocytosis: II: management of hematologic disorders in association with systemic mast cell disease. *J Invest Dermatol* 1991b;96:52S-4S.
59. Pec M, Plank L, Szepe P, Belej K, Zubrikova L, Halakova E, et al. A case of systemic mastocytosis - an ultrastructural and immunohistochemical study of the dermal mast cells in relation to activation of the epidermal melanin unit. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 1998;11(3):258-61.
60. Qu Z, Liebler JM, Powers MR, Galey T, Ahmadi P, Huang XN, et al. Mast cells are a major source of a basic fibroblast growth factors in chronic inflammation and cutaneous haemangioma. *Am J Pathol* 1995;147:564-73.
61. Rimmer EF, Turberville C, Horon MA. Human mast cells detected by monoclonal antibodies. *J Clin Pathol* 1984;37:1249-55.
62. Schneider I, Schwartz RA. Mast cell disease. *Cutis* 1997;59:63-6.
63. Schwartz LB, Irani AA, Roller K, Castells MC, Schechter NM. Quantitation of histamine, tryptase and chymase in dispersed human T- and TC-mast cells. *J Immunol* 1987;138:2611-15.

64. Silva VD. Estudo comparativo entre microscopia ótica convencional e imagens microscópicas digitalizadas de derrames serosos (dissertação). Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 1995.
65. Sontheimer RD, Tharp MD. Immunological repertoire of the dermal microvascular unit. In: Nickoloff BJ, editor. *Dermal immune system*. 1st ed. CRD Press, Boca Ratón, USA; 1993. p.118-41.
66. Soter NA. The skin in mastocytosis. *J Invest Dermatol* 1991;96:32S-39S.
67. Stege H, Schöpf E, Ruzicka T, Krutmann J. High-dose UVA1 for urticaria pigmentosa. *Lancet* 1996;347:64.
68. Stein DH. Mastocytosis: a review. *Pediatr Dermatol* 1986;3:365-75.
69. Tharp MD. Mast cell disease and its diagnosis. *J Invest Dermatol* 1995;104(6):885-6.
70. Travis WD, Li CY, Bergstralh EJ, Yam LT, Swee RG. Systemic mast cell disease: analysis of 58 cases and literature review. *Medicine* 1988;67:345-68.
71. Walls AF, Jones DB, Williams JH, Church MK, Holgate ST. Immunohistochemical identification of mast cells in formaldehyde-fixed tissue using monoclonal antibodies specific for tryptase. *J Pathol* 1990;162:119-26.
72. Walsh LJ, Trinchieri G, Waldorf HÁ, Whitaker D, Murphy GF. Human dermal mast cells contain and release tumor necrosis factor alpha, which induces endothelial leukocyte adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:4220-4.
73. Weber S, Krasagakes SK, Grabbe J, Zuberbier T, Czarnetzki BM. Mast cells. *Int J Dermatol* 1995;34:1-10.
74. Weibel ER. *Stereological methods: practical methods for biological morphometry*. In: Weibel ER *Stereological methods*. New York: Academic Press; 1980.

75. Weidner N, Austen KF. Ultrastructural and immunohistochemical characterization of normal mast cells at multiple body sites. *J Invest Dermatol* 1991;96:26S-31S.
76. Worobec AS, Semere T, Nagata H, Metcalfe DD. Clinical correlates of the presence of the Asp816Val *c-kit* mutation in the peripheral blood mononuclear cells of patients with mastocytosis. *Cancer* 1998;83:2120-9.

Utilização de Material Biológico Descartado em Projetos de Pesquisa

Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde/GPPG/HCPA
Resolução Normativa 02/97

A Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde, vinculada ao Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, com o objetivo de estabelecer normas internas próprias para a utilização de material biológico descartado em projetos de pesquisa realizados no HCPA, tomando por base o [item III.3.f](#) das Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos (Resolução CNS 196/96) e a [Diretriz 9](#) das Diretrizes Éticas Internacionais para Pesquisas Biomédicas Envolvendo Seres Humanos (CIOMS 1993), dispõe que:

- a) a obtenção destes materiais biológicos não deve ocasionar alteração na rotina de exame ou procedimento envolvido;
- b) a utilização deste material é possível, caso o mesmo seja habitualmente descartado;
- c) as amostras serão mantidas anônimas, salvo que as novas informações geradas possam beneficiar diretamente ao próprio paciente;
- d) não deve haver necessidade de consultar o prontuário do paciente para coleta de outros dados. Se houver, deverá ser garantida a privacidade dos dados coletados, através da utilização do Termo de Compromisso para Utilização de Dados, e preservado o anonimato dos indivíduos, quando da divulgação dos resultados;
- e) as culturas de células, mantidas com a identificação do indivíduo doador, somente poderão ser desenvolvidas e mantidas com o consentimento informado prévio desta pessoa;
- f) o material biológico será utilizado exclusivamente para a finalidade prevista no projeto. Toda e qualquer outro uso deverá ser objeto de um novo projeto de pesquisa que deverá ser submetido à apreciação da Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde.

Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde/GPPG/HCPA. Resolução Normativa 02/97 - Utilização de Material Biológico Descartado em Projetos de Pesquisa. Aprovada na reunião conjunta das Comissões científica e de Pesquisa e Ética em Saúde de 09 de janeiro de 1997.

Anexo 2 Utilização de dados de prontuários de pacientes e de bases de dados em projetos de pesquisa

Utilização de Dados de Prontuários de Pacientes e de Bases de Dados em Projetos de Pesquisa

Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde/GPPG/HCPA

Resolução Normativa 01/97

A Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde, vinculada ao Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, com o objetivo de estabelecer normas internas próprias para a utilização de dados de prontuários de pacientes e de bases de dados em projetos de pesquisa realizados no HCPA, tomando por base os itens [III.3.i](#) e [III.3.t](#) das Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos (Resolução CNS 196/96) e a [Diretriz 12](#) das Diretrizes Éticas Internacionais para Pesquisas Biomédicas Envolvendo Seres Humanos (CIOMS 1993), dispõe que:

- a) o acesso aos dados registrados em prontuários de pacientes ou em bases de dados para fins de pesquisa científica será autorizado apenas para pesquisadores com projeto de pesquisa aprovado pela Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde;
- b) devido a impossibilidade de obtenção do Consentimento Informado de todos os pacientes, será utilizado um Termo de Compromisso de Utilização de Dados, a ser preenchido por todos os pesquisadores e colaboradores envolvidos na manipulação de dados;
- c) todas as pessoas, pesquisadores ou colaboradores, terão compromisso com a privacidade e a confidencialidade dos dados utilizados, preservando integralmente o anonimato dos pacientes;
- d) os dados obtidos somente poderão ser utilizados para o projeto ao qual se vinculam. Todo e qualquer outro uso que venha a ser planejado deverá ser objeto de novo projeto de pesquisa, que deverá ser submetido à apreciação da Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde;
- e) o Serviço de Arquivo Médico e de Informações em Saúde (SAMIS) e o Grupo de Sistemas (GSIS) somente poderão liberar dados para fins de pesquisa científica para projetos aprovados, com a devida autorização pelo Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação.

Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde/GPPG/HCPA. Resolução Normativa 01/97 - Utilização de Dados de Prontuários de Pacientes e de Bases de Dados em Projetos de Pesquisa. Aprovada na reunião conjunta das Comissões científica e de Pesquisa e Ética em Saúde de 09 de janeiro de 1997.

Anexo 3 Ficha com dados de identificação, história, exame físico e avaliação laboratorial**HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE****MASTOCITOSE NA INFÂNCIA: ESTUDO ANATOMO-PATOLÓGICO E IMUNO-HISTOQUÍMICO****Identificação**

Nome: _____ Prontuário: _____ Número: _____

Endereço: _____

Telefone para contato: _____

Mãe: _____

Data de nascimento: __/__/__ Sexo: feminino masculino

Naturalidade: _____

Diagnóstico de MastocitoseData da biópsia: __/__/__ Local do diagnóstico: ambulatório/consultório internaçãoOrigem do paciente: consultório privado SUS

Data do início da apresentação dos sintomas: __/__/__ ou

Idade de apresentação: _____ anos _____ meses

Manifestação Clínica

Apresentação cutânea: mastocitoma urticária pigmentosa
 telangiectasia macularis eruptiva perstans
 mastocitose bolhosa mastocitose cutânea difusa

Localização das lesões: cabeça e pescoço tronco
 membros superiores membros inferiores
 generalizado

Prurido: sim nãoManifestação gastrointestinal sim não

diarréia
 dor abdominal
 náuseas
 outra

Qual: _____

Manifestação cardiovascular sim não

flushing
 hipertensão
 hipotensão
 outra

Qual: _____

Manifestação óssea sim não

dor óssea
 outra

Qual: _____

Manifestação neurológica sim não
 outra
 Qual: _____

Hepatomegalia: sim não
 Esplenomegalia: sim não
 Linfadenopatia: sim não

Exames Laboratoriais

Exames gerais: hemograma _____
 plaquetas _____
 TGO _____
 TGP _____
 bilirrubinas _____

Radiografias ósseas: osteólise focal osteoesclerose focal
 osteoporose
 outras _____

Medula óssea: aspirado _____
 biópsia _____

Mastocitose sistêmica: sim não

Tratamento e Evolução

Tratamento realizado: antagonistas H1 _____
 tempo tto: _____
 antagonistas H2 _____
 tempo tto: _____
 cromoglicato dissódico
 tempo tto: _____
 cetotifeno
 tempo tto: _____
 corticóides tópicos _____
 tempo tto: _____
 outros _____
 tempo tto: _____

Evolução: persistência
 desconhecido
 melhora parcial com o tratamento
 melhora completa com o tratamento
 melhora parcial sem tratamento
 melhora completa sem tratamento

Observações:

Anexo 4 Ficha da avaliação histológica com coloração HE e Giemsa

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
**MASTOCITOSE NA INFÂNCIA: ESTUDO ANATOMO-
PATOLÓGICO E IMUNO-HISTOQUÍMICO**

Exame AP: _____

Número: _____

Número de mastócitos por campo de 200 X: _____ - _____ - _____ - _____ - _____
_____ - _____ - _____ - _____ - _____

Infiltração de mastócitos: sim não

Mastócitos perivasculares: sim não

Mastócitos perineurais: sim não

Agregados nodulares de mastócitos: sim não

Presença de eosinófilos: sim não

Vesícula ou bolha: sim não

Anexo 5 Características gerais das 33 crianças incluídas no estudo

Nº Caso	Iniciais	Sexo	Idade (meses)	Idade no Diagnóstico (meses)	Intervalo (meses) ¹	Local do Diagnóstico
1	CSB	F	144	174	30	A
2	LGMS	M	2	6	4	A
3	JPB	M	2	10	8	A
4	LPM	M	12	18	6	A
5	EAD	M	64	76	12	A
6	JMR	M	1	6	5	A
7	WSM	M	2	9	7	A
8	JSV	F	48	72	24	A
9	RT	M	0	51	51	A
10	RMG	M	4	7	3	A
11	MCH	M	24	166	142	A
12	CDK	M	4	16	12	A
13	KTPS	F	4	1	3	A
14	AFM	M	24	0	24	A
15	CMB	M	6	146	140	A
16	EVS	F	61	66	5	A
17	FOL	M	5	11	6	A
18	FAM	M	8	10	2	A
19	GEC	M	3	39	36	A
20	GSS	M	1	5	4	A
21	GSS	M	1	9	8	A
22	GBG	F	3	71	68	A
23	JPVC	M	0	7	7	A
24	LMF	F	4	15	11	H
25	NTL	F	120	120	0	H
26	TCLM	F	0	3	3	A
27	TSA	F	1	7	6	H
28	VCDD	M	6	9	3	A
29	FC	M	110	123	13	A
30	MKF	F	2	9	7	A
31	VG	F	25	37	12	A
32	IOS	M	6	20	14	A
33	MESF	F	36	41	5	A

¹ Tempo entre manifestação e o diagnóstico

M = masculino F = feminino A = ambulatório ou consultório H = internação hospitalar

P = consultório privado RP = rede pública de atendimento (Sistema Único de Saúde - SUS)

Anexo 6 Características clínicas das 33 crianças incluídas no estudo

Nº Caso	Cutânea ¹	Localização das Lesões	Prurido	Sistêmica ²	Gastro-intestinais ³	Cardio-vasculares ³	Ósseas ³	Neuro-lógicas ³	Hepato-megalia	Esplenomegalia
1	UP	Membros Inferiores	Sim	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não
2	M	Tronco	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não
3	M	Membros Superiores	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não
4	M	Cabeça, Pescoço e Tronco	Sim	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não
5	M	Tronco	Sim	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não
6	UP	Tronco	Sim	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não
7	UP	Generalizado	Sim	Sim	Não	Não	Não	Não	Sim	Sim
8	M	Membros Inferiores	Sim	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não
9	UP	Tronco	Sim	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não
10	UP	Tronco, Membros Superiores e	Sim	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não

33	M	Membros Inferiores	Sim	Não						
----	---	--------------------	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

¹ Mastocitose cutânea

² Mastocitose sistêmica

³ Manifestações

⁴ Alterações encontradas no hemograma

⁵ Alterações encontradas no aspirado de medula óssea

M = mastocitoma UP = urticária pigmentosa MB = mastocitose bolhosa

- Desconhecido ou não realizado

Anexo 7 Achados histológicos e imuno-histoquímicos encontrados na amostra

Nº Caso	Infiltração difusa	Mastócitos perivasculars	Mastócitos perineurais	Mastócitos agregados	Eosinófilos	Clivagem	Hi
1	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Não	
2	Não	Sim	Não	Não	Sim	Não	
3	Sim	Sim	Não	Não	Não	Não	
4	Não	Sim	Não	Não	Sim	Não	
5	Não	Não	Não	Não	Sim	Não	
6	Não	Não	Não	Não	Não	Não	
7	Não	Não	Não	Não	Sim	Não	
8	Não	Não	Não	Não	Sim	Não	
9	Não	Não	Não	Não	Não	Não	
10	Não	Não	Não	Não	Não	Não	
11	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Não	
12	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Não	
13	Sim	Sim	Não	Não	Não	Não	
14	Sim	Não	Não	Sim	Não	Sim	
15	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Não	
16	Sim	Sim	Não	Não	Não	Não	
17	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Não	
18	Sim	Sim	Não	Sim	Não	Não	
19	Sim	Sim	Não	Sim	Não	Não	
20	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Não	
21	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Não	
22	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Não	
23	Sim	Sim	Não	Não	Não	Não	
24	Não	Não	Não	Não	Sim	Não	
25	Sim	Sim	Não	Não	Não	Não	
26	Sim	Sim	Não	Não	Não	Não	
27	Sim	Sim	Não	Não	Não	Não	
28	Não	Sim	Não	Não	Não	Não	
29	Não	Não	Não	Não	Sim	Não	
30	Sim	Sim	Não	Sim	Não	Não	
31	Não	Sim	Não	Não	Não	Não	
32	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	Não	
33	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Não	

¹ Número de mastócitos/mm², corados por Giemsa e contados manualmente² Número de mastócitos/mm², marcados por anticorpo antitriptase e contados por análise digital de imagem