

LUCIANA TERRA BABETO

Histiocitose das Células de Langerhans na  
criança: revisão dos achados clínicos,  
anátomo-patológicos e imuno-histoquímicos  
dos casos diagnosticados no Hospital das  
Clínicas da UFMG – 1988 a 2008

---

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**BELO HORIZONTE**  
**2009**

LUCIANA TERRA BABETO

Histiocitose das Células de Langerhans na  
criança: revisão dos achados clínicos,  
anátomo-patológicos e imuno-histoquímicos  
dos casos diagnosticados no Hospital das  
Clínicas da UFMG – 1988 a 2008

---

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação  
da Faculdade de Medicina da Universidade Federal  
de Minas Gerais, com vistas à obtenção do título de mestre  
em Ciências da Saúde na Área de Concentração  
Saúde da Criança e do Adolescente

Orientadora: Profa Benigna Maria de Oliveira  
Co-orientador: Prof. Marcos Borato Viana

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**BELO HORIZONTE**  
**2009**

**Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde**  
**Área de Concentração em Saúde da Criança e do Adolescente**

Reitor: Prof. Ronaldo Tadêu Pena

Vice-Reitora: Prof<sup>a</sup>. Heloisa Maria Murgel Starling

Pró-Reitora de Pós-Graduação: Prof<sup>a</sup>. Elizabeth Ribeiro da Silva

Pró-Reitor de Pesquisa: Prof. Carlos Alberto Pereira Tavares

Diretor da Faculdade de Medicina: Prof. Francisco José Penna

Vice-Diretor da Faculdade de Medicina: Prof. Tarcizo Afonso Nunes

Coordenador do Centro de Pós-Graduação: Prof. Carlos Faria Santos Amaral

Subcoordenador do Centro de Pós-Graduação: João Lúcio dos Santos Jr.

Chefe do Departamento de Pediatria: Prof<sup>a</sup>. Maria Aparecida Martins

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – Área de Concentração em Saúde da Criança e do Adolescente: Prof. Joel Alves Lamounier

Subcoordenadora do Programa de Pós-Graduação em Medicina - Área de Concentração em Pediatria: Prof<sup>a</sup>. Ana Cristina Simões e Silva

Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – Área de Concentração em Saúde da Criança e do Adolescente:

Prof<sup>a</sup>. Ivani Novato Silva

Prof. Jorge Andrade Pinto

Prof<sup>a</sup>. Lúcia Maria Horta Figueiredo Goulart

Prof<sup>a</sup>. Maria Cândida Ferrarez Bouzada Viana

Prof. Marco Antônio Duarte

Prof<sup>a</sup>. Regina Lunardi Rocha

Gustavo Sena Sousa (Repr. Discente)

**Para meus pais e irmãos**

**Para Fábio, com amor**

*“Agora vemos por espelho em enigma;  
mas, então, veremos face a face;  
agora, conheço em parte, mas, então  
conhecerei como também sou conhecido.”*

*(I Carta de São Paulo aos Coríntios)*

## **Agradecimentos**

À Prof<sup>a</sup> Benigna Maria de Oliveira, pela orientação, dedicação, apoio, perseverança, por tudo o que me ensinou e ainda ensina. Você é um exemplo do que almejo ser como médica, professora e ser humano.

Ao Prof. Marcos Borato Viana pelo auxílio fundamental em todas as fases da realização desse trabalho. Obrigada por todas as sugestões e correções, sempre apropriadas e perspicazes, e pela atenção a mim dispensada.

À Prof<sup>a</sup> Lúcia Porto Fonseca de Castro, responsável pela realização de todos os exames e sem a qual esse trabalho não seria possível. Agradeço por todos os ensinamentos, pelo auxílio na elaboração da dissertação, e por todo o carinho, respeito, disponibilidade e generosidade com que sempre fui recebida.

À Lurdinha, braço direito da Prof<sup>a</sup> Lúcia e, por consequência, meu também. Obrigada por me dar todo o auxílio de que necessitei.

Ao Serviço de Anatomia Patológica e ao Serviço de Dermatologia do HC-UFMG por permitirem que a pesquisa e revisão das amostras fossem realizadas. Agradeço especialmente às secretárias que me orientaram e ajudaram na procura desses materiais.

A todos os membros e amigos do Serviço de Hematologia do HC-UFMG que me deram apoio, incentivo e contribuíram para minha formação profissional.

À bolsista de iniciação científica Maria Thereza Macedo Valadares pelo cuidado na coleta dos dados e interesse pelo trabalho.

Aos meus professores e alunos com quem aprendo algo novo a cada dia.

Aos amigos da Maternidade Municipal de Contagem pelo apoio, compreensão, cobertura em plantões e pela torcida. Muito obrigada!

A meus pais pelo carinho e apoio incondicionais e por fazerem de mim o que sou hoje.

Ao Fábio por seu amor, amizade e compreensão. Por me ajudar a resolver todos os problemas, sempre e em qualquer situação.

Aos pacientes e seus pais por depositarem em nós seus medos e angústias, mas também alegrias e por confiarem em que, juntos, sempre buscaremos fazer o melhor. Obrigada por participarem desse trabalho.

A Deus, pelo presente da vida, por minha família, pela profissão maravilhosa que Ele me deu e por estar comigo em cada momento dessa caminhada.

## Resumo

**Objetivos:** Rever os achados clínicos, anátomo-patológicos e imuno-histoquímicos das crianças e adolescentes com diagnóstico prévio de Histiocitose de Células de Langerhans (HCL), visando a estabelecer o diagnóstico definitivo por meio da pesquisa do antígeno CD1a. Comparar a evolução da doença de acordo com a idade, gênero, estadiamento ao diagnóstico, resposta à sexta semana de tratamento e grau de certeza diagnóstica.

**Material e métodos:** Análise retrospectiva dos dados referentes a 37 crianças com HCL acompanhadas no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais no período de 1988 a 2008. Os dados foram obtidos a partir da revisão dos prontuários e das amostras de biópsias dos pacientes sem diagnóstico definitivo prévio. O diagnóstico definitivo foi realizado com base na positividade para o antígeno de superfície CD1a à imuno-histoquímica ou na presença de grânulos de Birbeck nos histiócitos à microscopia eletrônica.

**Resultados:** Antes do estudo, 13 (35,1%) dos 37 pacientes apresentavam diagnóstico definitivo, isto é, o grau máximo de certeza diagnóstica. Doze (50%) dos 24 pacientes sem diagnóstico definitivo tiveram material de biópsia localizado e revisado. Todos os casos revisados foram positivos para o antígeno CD1a. Ao término do estudo foi possível o diagnóstico definitivo em 25 dos 37 pacientes (67,5%). O tempo de seguimento dos pacientes variou de 1 mês a 20,9 anos (mediana de 6,2 anos). A idade ao diagnóstico variou de 1 mês a 16,9 anos (mediana de 2,4 anos). Dezesete crianças eram do gênero masculino (45,9%). As manifestações clínicas mais comuns ao diagnóstico foram lesões osteolíticas (67,6%). Dezenove pacientes apresentavam doença multissistêmica (51%). A sobrevida global (SGLO) para todo o grupo foi de 88,5% (IC 95% 72,1 a 95,5%). Todos os óbitos ocorreram em pacientes com doença multissistêmica e disfunção de órgãos ao diagnóstico. A SGLO foi significativamente maior para os pacientes com resposta “melhor” à sexta semana de tratamento, em comparação aos “sem resposta”. A sobrevida global foi significativamente maior para os pacientes com doença unissistêmica. A probabilidade de sobrevida livre de eventos (SLE) para todo o grupo foi de 32,5% (IC 95% 17,9 a 48,1%) aos 10 anos, sendo significativamente maior para os pacientes com resposta “melhor” à sexta semana de tratamento e para os pacientes com idade maior ou igual a três anos. Não houve diferença na SGLO e SLE quando comparados os pacientes com diagnóstico definitivo com os demais. Episódios de reativação ocorreram em 75% dos pacientes com doença multissistêmica. A sequela mais comum foi o *diabetes insipidus*, ocorrendo em 21,6% dos pacientes.

**Conclusões:** O estudo aumentou o grau de certeza diagnóstica, com a maioria dos pacientes apresentando diagnóstico definitivo após sua realização. As estimativas de sobrevida global e de sobrevida livre de eventos foram semelhantes aos de estudos multicêntricos internacionais. Os principais fatores de mau prognóstico com relação à sobrevida global foram doença multissistêmica e ausência de resposta à sexta semana de tratamento. A frequência de reativações para os pacientes com doença multissistêmica foi maior que a descrita pela literatura.

## Abstract

**Objectives:** To review clinical, histopathological and immunohistochemical findings of children and adolescents with previous diagnosis of Langerhans cell histiocytosis (LCH), in order to establish the definitive diagnosis through CD1a antigen staining. To compare the disease outcome according to age, sex, stage of the disease, treatment response and level of diagnostic accuracy.

**Material and methods:** Retrospective analysis of data on 37 children with Langerhans cell histiocytosis followed up at Hospital das Clínicas of Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil, between 1988 and 2008. The study was carried out using the data abstracted from medical charts and by reviewing biopsies of the patients without previous definitive diagnosis. The definitive diagnosis was defined as that made possible through the detection of Birbeck granules on electron microscopy, or CD1a antigen immunostaining of Langerhans cells.

**Results:** Before the study, 13 (35,1%) of the 37 patients had “definitive” diagnosis, the highest level of diagnostic accuracy. The samples of twelve (50%) of the 24 patients without definitive diagnosis were located and reviewed. All reviewed cases were positive for CD1a antigen. By the end of the study, 25 of the 37 patients (67,5%) had a definitive diagnosis. The follow-up period ranged from 1 month to 20.9 years, with a median of 6.2 years. Age at diagnosis ranged from 1 month to 16.9 years, with a median of 2.4 years. Seventeen children were male (45,9%). The most common clinical manifestations at diagnosis were osteolytic lesions (67,6%). Multisystem disease was present in 19 patients (51%). The estimated overall survival (OS) probability was 88.5% (95%CI 72.1% to 95.5%). All deaths occurred in patients with multisystem disease and organ dysfunction at diagnosis. Those patients who had a “better” response to treatment in the sixth week were likely to have a significantly higher OS rate than those without response. OS rate was significantly higher for patients with single-system disease. The disease-free survival estimation for the whole group was 32.5% at 10 years (95%CI: 17.9% to 48.1%); it was significantly higher for patients with “better” response at six weeks of treatment and for patients with age 3 or more. There was no difference in OS and EFS when patients with definitive diagnosis were compared with the others. Reactivation episodes occurred in 75% of the patients with multisystem disease. *Diabetes insipidus* was the most common sequela, occurring in 21.6% of the patients.

**Conclusions:** The study increased the level of diagnostic accuracy, with the majority of the patients having definitive diagnosis at the end of it. The overall survival and event-free survival rates were similar to international multicentric studies. Multisystem disease and absence of response at six weeks of treatment were the most important prognostic factors to predict worse outcome in overall survival. The frequency of reactivations for the patients with multisystem disease was higher than described in the literature.

## Índice de Figuras

<b>Figura 1:</b> Árvore de linhagem de histiócitos .....	22
<b>Figura 2:</b> Protocolo de tratamento dos estudos DAL-HX 83 e DAL-HX 90 .....	62
<b>Figura 3:</b> Esquema de tratamento do LCH I .....	63
<b>Figura 4:</b> Esquema de tratamento do LCH II .....	65
<b>Figura 5:</b> Esquema de indução do LCH III (cursos 1 e 2) para o grupo de alto risco .....	67
<b>Figura 6:</b> Esquema de manutenção do LCHIII para o grupo de alto risco .....	68
<b>Figura 7:</b> Esquema de tratamento do LCHIII (indução e manutenção) para o grupo de Baixo Risco .....	69
<b>Figura 8:</b> Esquema de tratamento do LCHIII para doença óssea multifocal .....	70
<b>Figura 9:</b> Método Estreptavidina- Biotina marcada .....	82
<b>Figura 10:</b> Distribuição dos pacientes de acordo com a faixa etária .....	89
<b>Figura 11:</b> Número e porcentagem de casos por categoria diagnóstica antes e após o estudo .....	91
<b>Figura 12:</b> Distribuição dos pacientes de acordo com o estadiamento ao diagnóstico .....	95
<b>Figura 13:</b> Distribuição das 37 crianças portadoras de HCL de acordo com a resposta à sexta semana de tratamento .....	97
<b>Figura 14:</b> Probabilidade de sobrevida global das 37 crianças portadoras de HCL .....	100
<b>Figura 15:</b> Probabilidade de sobrevida livre de eventos em 37 crianças portadoras de HCL .....	102
<b>Figura 16:</b> Linfonodo com infiltração por células de Langerhans (HE) .....	138
<b>Figura 17:</b> Mucosa oral com infiltração por células de Langerhans (HE, CD1a e proteína S100) .....	139
<b>Figura 18:</b> Célula de Langerhans com presença de grânulos de Birbeck (ME) .....	139

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1:</b> Marcadores dos histiócitos por técnicas de imuno-histoquímica e microscopia eletrônica .....	31
<b>Tabela 2:</b> Classificação contemporânea das desordens histiocíticas .....	38
<b>Tabela 3:</b> Categorização dos pacientes com HCL de acordo com a extensão da doença ..	50
<b>Tabela 4:</b> Avaliação laboratorial e radiológica indicada para novos pacientes com HCL .	52
<b>Tabela 5:</b> Avaliação sob indicações específicas .....	53
<b>Tabela 6:</b> Sistema de escore do Protocolo de Histiocitose de Células de Langerhans (LCH) III da <i>Histiocyte Society</i> .....	54
<b>Tabela 7:</b> Escore clínico para atividade de doença na HCL .....	55
<b>Tabela 8:</b> Número de casos revisados por grupo de certeza diagnóstica .....	90
<b>Tabela 9:</b> Blocos de parafina revisados em 15 pacientes, diagnóstico prévio e perfil imuno-histoquímico verificado .....	92
<b>Tabela 10:</b> Manifestações clínicas encontradas ao diagnóstico .....	93
<b>Tabela 11:</b> Distribuição das 37 crianças portadoras de HCL de acordo com o tratamento inicial .....	96
<b>Tabela 12:</b> Resposta à sexta semana de tratamento de acordo com o estadiamento .....	98
<b>Tabela 13:</b> Evolução dos sete pacientes com disfunção de órgãos ao diagnóstico .....	99
<b>Tabela 14:</b> Número e tipo de sequelas permanentes encontradas em 15 dos 37 pacientes com HCL .....	104
<b>Tabela 15:</b> Crianças portadoras de HCL tratadas no HC-UFMG no período de 1988 a 2008 .....	105

## Lista de abreviaturas

**2- CDA:** 2-clorodeoxiadenosina

**6-MP:** 6- mercaptopurina

**ADM :** doxorubicina

**AELA:** atividade endógena de ligação à avidina

**ALT:** Alanina aminotransferase

**Ara-C:** citarabina

**AST:** Aspartato aminotransferase

**CGMs:** células gigantes multinucleadas

**CLs:** células de Langerhans

**CMV:** citomegalovírus

**COEP:** Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG

**DAB:** 3,3'- diaminobenzidinetetrahydroclorido

**DAL-HX:** *Deutsche Arbeitsgemeinschaft für Leukaemieforschung*

**DI:** *Diabetes insipidus*

**EBV:** Espstein-Barr vírus

**FAP:** Fosfatase alcalina placentária

**GBs:** Grânulos de Birbeck

**HCL:** Histiocitose de células de Langerhans

**HC-UFMG:** Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais

**HE:** hematoxilina e eosina

**HHV-6:** Herpes vírus humano tipo 6

**HIV:** vírus da imunodeficiência humana

**HSV:** Herpes Simples vírus

**HTLV I e II :** vírus linfotrópico humano I e II

**IFN- $\gamma$ :** Interferon gama

**IMH:** imuno-histoquímica

**LCH CNS STUDY GROUP:** Grupo de estudos em Histiocitose de Células de Langerhans do sistema nervoso central - *Histiocyte Society*

**LCH:** *Langerhans cell histiocytosis*

**LCH-HCT:** Grupo de estudos em transplante após condicionamento de intensidade reduzida- *Histiocyte Society*

**LCH-S:** Grupo de estudos da *Histiocyte Society* em terapia de resgate para HCL refratária

**LMA-M3:** Leucemia Promielocítica Aguda

**M.O:** medula óssea

**ME:** Microscopia eletrônica

**MHC:** complexo principal de histocompatibilidade

**MTX:** methotrexate

**NK:** *Natural Killer*

**PBS:** tampão phosphate-buffered-saline

**PCR:** reação de cadeia de polimerase

**PDN:** prednisona

**PET-SCAN :** Tomografia de Emissão de Pósitrons

**PSL:** prednisolona

**PV:** Parvovírus

**QT:** quimioterapia

**RNM:** ressonância nuclear magnética

**SAME :** Serviço de Arquivo Médico

**SGLO:** sobrevida global

**SLE:** sobrevida livre de eventos

**SNC:** Sistema Nervoso Central

**TC:** Tomografia computadorizada

**TCLE:** termo de consentimento livre e esclarecido

**VCR:** vincristina

**VMB:** vimblastina

**VP-16:** etoposideo

## Sumário

<b>Introdução</b> .....	16
<b>Revisão da literatura</b>	
1. Definição .....	18
2. Aspectos históricos .....	18
3. Células de Langerhans.....	21
3.1 Origem e diferenciação .....	21
3.2 Função .....	23
3.3 Célula normal <i>versus</i> patológica .....	23
3.4 Histopatologia .....	24
3.4.1 Histopatologia da lesão em órgãos específicos .....	25
3.5 Imuno-histoquímica.....	29
3.6 Microscopia eletrônica .....	32
4. Epidemiologia .....	33
5. Etiologia .....	33
5.1 Fatores de risco .....	34
5.2 Herança genética .....	34
5.3 Sistema imune .....	35
5.4 Origem tumoral <i>versus</i> inflamatória .....	35
5.5 Infecções .....	36
6. Classificação .....	36
6.1 Nomenclatura .....	37
6.2 Células de origem das desordens histiocíticas .....	37
6.3 Critérios diagnósticos .....	39
7. Diagnóstico diferencial .....	39
7.1 Xantogranuloma juvenil .....	39
7.2 Síndromes hemofagocíticas .....	40
7.3 Doença de Rosai- Dorfman .....	40
7.4 Doenças malignas relacionadas a monócito .....	41
8. Manifestações clínicas .....	42
8.1 Ossos .....	42

8.2	Pele .....	44
8.3	Linfonodos .....	45
8.4	Órgãos de risco .....	45
8.5	Trato gastrointestinal .....	46
8.6	Alterações endócrinas .....	46
8.7	Sistema Nervoso Central .....	47
9.	Estadiamento .....	48
10.	Critérios de avaliação clínica e laboratorial .....	51
11.	Avaliação da resposta ao tratamento .....	54
12.	Tratamento .....	57
12.1	Doença unissistêmica .....	57
12.2	Doença multissistêmica .....	58
12.3	Diretrizes da <i>Histiocyte Society</i> para a avaliação e tratamento dos pacientes com HCL .....	70
13.	Tratamentos de resgate para doença resistente .....	72
14.	Reativações e sequelas .....	74
<b>Estudo</b>		
1.	Objetivos .....	77
2.	Material e métodos .....	77
3.	Resultados .....	89
4.	Discussão .....	106
5.	Conclusões .....	114
<b>Referências Bibliográficas</b> .....		115
<b>Anexos</b>		
	Anexo 1 .....	128
	Anexo 2 .....	134
	Anexo 3 .....	136
	Anexo 4 .....	138

## Introdução

A Histiocitose das células de Langerhans (HCL) é uma doença rara, que acomete principalmente crianças. É causada pela proliferação clonal das células de Langerhans, de etiologia ainda não esclarecida, que pode acometer virtualmente qualquer órgão /tecido do corpo. As manifestações clínicas são resultantes desse acometimento e podem variar desde lesões isoladas que evoluem para remissão espontânea até o envolvimento multissistêmico grave levando ao óbito. Podem, ainda, deixar sequelas graves e permanentes ou determinar morbidade importante, com frequentes reativações. Conforme a apresentação clínica, o tratamento pode variar desde conduta expectante, excisão cirúrgica das lesões, corticoterapia, quimioterapia, combinação de todos os anteriores, até transplante de medula óssea.

O diagnóstico é feito por meio de história clínica compatível associada à biópsia das lesões. De acordo com a *International Histiocyte Society* (THE CLINICAL WRITING GROUP OF HISTIOCYTE SOCIETY, 1987), o diagnóstico é considerado **definitivo** apenas se, associado à histologia característica, houver positividade para o antígeno de superfície CD1a à imuno-histoquímica ou for demonstrada a presença de grânulos de Birbeck nos histiócitos à microscopia eletrônica.

Em Minas Gerais, o Grupo de Hematologia Pediátrica do Serviço de Hematologia do Hospital das Clínicas da UFMG (HC-UFMG) é referência para o tratamento da doença e desenvolve uma linha de pesquisa que se dedica ao estudo da HCL, desde 1988 (VIANA et al., 1991; CAMPOS et al., 2007). Desde então, 37 crianças foram diagnosticadas e tratadas no serviço, constituindo-se em uma das maiores casuísticas relatadas em uma única instituição.

São poucos os relatos sobre a experiência de grupos brasileiros no diagnóstico e tratamento da doença, pouco conhecida e estudada entre onco-hematologistas e pediatras. A maioria das publicações brasileiras são relatos de caso (DE CAMARGO et al, 1993; LOPES & DE CAMARGO, 1999; TAKAHAMA JR et al., 2008; FERREIRA et al., 2006; LOURENÇO et al., 2005). Estudo retrospectivo realizado em Curitiba (KUCZYNSKI et al., 2000) avaliou 20 pacientes com diagnóstico prévio de HCL com o objetivo de revisar as biópsias anteriores com realização de pesquisa de CD1a, além de descrever

aspectos clínicos e epidemiológicos. Em dez casos havia material disponível para revisão e em um deles o diagnóstico definitivo não foi confirmado. Pesquisadores de São Paulo revisaram 2356 biópsias de lesões em cavidade oral de crianças, sendo a HCL o “tumor não odontogênico” mais frequentemente encontrado (SOUSA et al., 2002).

Em estudo concluído no ano de 2005 (CAMPOS et al., 2007) foi realizada uma análise retrospectiva da evolução clínica dos casos de HCL em pacientes pediátricos do HC-UFMG, comparando sua evolução de acordo com a idade, estadiamento e resposta ao tratamento. O diagnóstico definitivo da HCL foi possível em apenas sete das 33 crianças incluídas no estudo, tendo sido firmado por meio da pesquisa do antígeno de superfície CD1a em quatro casos e a partir da microscopia eletrônica em três. Até 2004, o diagnóstico definitivo por meio da pesquisa do antígeno CD1a foi realizado em outros serviços, em função da indisponibilidade do anticorpo adequado para uso em cortes processados em parafina no HC-UFMG. Na maioria dos casos, o diagnóstico foi presuntivo. O ideal é que o diagnóstico definitivo pudesse ter sido realizado em todos os pacientes, inclusive para uma comparação mais fidedigna com os resultados dos estudos cooperativos internacionais, nos quais são incluídos somente os pacientes com diagnóstico definitivo.

O presente estudo faz uma revisão dos achados anátomo-patológicos, com a realização da imuno-histoquímica dos casos diagnosticados e/ ou tratados no HC-UFMG até outubro de 2008 visando à confirmação do diagnóstico com a pesquisa do referido antígeno. A partir desses achados, a evolução clínica dos pacientes foi reavaliada. Nesse sentido, este trabalho pretende contribuir para o entendimento dessa doença rara, permitir a comparação com estudos internacionais e servir de base para novos estudos.

## Revisão da literatura

### 1. Definição

O termo “histiocitose” refere-se a um grupo heterogêneo de doenças causadas pela proliferação dos histiócitos, termo genérico para denominar os constituintes do sistema fagocítico-mononuclear (ou reticulo-endotelial), cujos principais representantes são os macrófagos e as células dendríticas. No sistema imune, essas células exercem a função de fagocitose, eliminação de patógenos, processamento e apresentação de antígenos a linfócitos (HUANG & ARCECI, 1999).

As células de Langerhans são constituintes normais da junção derme/epiderme e fazem parte da família de células dendríticas, cuja principal função é a de apresentação de antígenos (McCLAIN et al., 2004).

A Histiocitose de Células de Langerhans (HCL) é causada pela proliferação clonal de células de Langerhans anormais, de etiologia ainda desconhecida. Qualquer órgão/sistema pode ser acometido, resultando em manifestações clínicas diversas dependendo do órgão acometido ou do grau de comprometimento do mesmo. É uma doença rara, que acomete principalmente as crianças. De maneira geral, é responsável por baixas taxas de mortalidade, embora possa determinar morbidade significativa, quer seja por suas frequentes reativações ou por suas possíveis sequelas, que podem ser graves e irreversíveis.

A HCL é considerada, ainda hoje, uma “doença enigmática” (SAVASAN, 2006), mas importantes avanços foram alcançados nas últimas décadas no entendimento de sua origem, uniformização da nomenclatura a ela relacionada e no desenvolvimento de grandes estudos de cooperação internacional para seu tratamento.

### 2. Aspectos históricos

Karl Aschoff, patologista alemão, foi quem introduziu o termo “sistema reticulo-endotelial”. O prefixo “reticulo” refere-se à característica das células desse compartimento de formar uma rede de extensões citoplasmáticas, enquanto

“endotelial” refere-se ao fato de que as mesmas estão, com frequência, situadas perto de células endoteliais vasculares (ARCECI, 1999).

Em 1868, aos vinte e um anos de idade, o então estudante de medicina da Universidade de Berlim chamado Paul Langerhans (1847-1888) publicou seu trabalho descrevendo de maneira precisa um novo tipo de célula dendrítica da epiderme, atualmente conhecida como Célula de Langerhans, em sua homenagem. Em 1865, o Dr. Thomas Smith publicou o caso de uma criança de quatro anos que apresentava impetigo e três grandes falhas ósseas no crânio. Na época, o quadro foi considerado como uma anomalia congênita, mas após revisão, o diagnóstico foi sugestivo de Histiocitose de Células de Langerhans (BROADBENT, 1994).

Em 1893, Alfred Hand apresentou o caso de uma criança de três anos de idade com exoftalmia, sede intensa e poliúria. A criança faleceu dois meses depois. Em 1905, Thomas Kay apresentou o caso de um menino de sete anos que apresentava a tríade exoftalmia, *diabetes insipidus* e defeitos ósseos. Em 1915, Arthur Schüller descreveu o caso de um adolescente de dezesseis anos com queixas visuais e de uma menina de quatro anos com exoftalmia, sede intensa e poliúria. Em 1920, Henry Christian publicou um artigo onde descrevia o caso de uma menina de cinco anos com defeitos ósseos no crânio, exoftalmia e *diabetes insipidus*. A partir desses relatos, surgiu o epônimo “Doença de Hand-Schüller-Christian”, referindo-se a uma doença caracterizada por exoftalmia, lesões nos ossos do crânio e *diabetes insipidus* (COPPES-ZANTINGA & EGELER, 2002).

Erich Letterer, em 1924, descreveu uma condição aguda fatal e não leucêmica do sistema retículo-endotelial em uma criança de seis meses de idade. Nove anos depois, Sture Siwe descreveu um quadro semelhante em uma lactente de um ano e meio. Em seu artigo, Siwe agrupou os seus casos com os relatados anteriormente, incluindo o de Letterer, em uma entidade clínica e patológica bem definida. Ele caracterizou a condição por esplenomegalia acentuada, hepatomegalia, linfadenopatia, tumores ósseos localizados, tendência hemorrágica, anemia secundária e hiperplasia generalizada de macrófagos em vários órgãos. Em 1936, Abt & Denenholz

fizeram a primeira referência à Doença de Letterer – Siwe (COPPES-ZANTINGA & EGELER, 2002).

Em 1930, Dr. Mignon descreveu lesões ósseas granulomatosas em um menino de doze anos. O termo “granuloma eosinofílico” surgiu em 1940, quando Otani & Erlich e, alguns meses depois Lichtenstein & Jaffe publicaram casos semelhantes ao de Mignon, caracterizados por granulomas ósseos histologicamente constituídos por histiócitos e eosinófilos. Um ano depois, Dr. Sidney Farber notou que todas as três condições (Letterer-Siwe, Schüller-Christian e o estudo evolutivo das lesões ósseas em Schüller-Christian) representavam variações do grau, estágio de envolvimento e localização do mesmo processo básico de doença. Em 1944, Jaffe & Lichtenstein afirmaram que o granuloma eosinofílico do osso, a doença de Letterer-Siwe e a de Hand-Schüller-Christian representavam expressões clínicas diferentes da mesma desordem básica, que mostrava predileção pelo sistema hematopoiético. Em 1953, Lichtenstein propôs uma unificação da nomenclatura em torno do termo “Histiocitose X”, denotando a natureza da reação proliferativa e inflamatória dos histiócitos, além da complexidade da doença e necessidade da descoberta de seu agente etiológico (COPPES-ZANTINGA & EGELER, 2002).

Em 1961, Birbeck e colaboradores descreveram pela primeira vez aspectos ultraestruturais dessas células. Seu estudo tornou possível a identificação precisa das Células de Langerhans através de suas organelas características atualmente conhecidas como grânulos de Birbeck. Em 1973, Nézelof e colaboradores concluíram que a Histiocitose X era resultante da proliferação patológica e disseminada das Células de Langerhans, postulado que foi reconhecido somente em 1983, quando membros da Universidade de Minnesota sugeriram a mudança do nome “Histiocitose X” para “Histiocitose de Células de Langerhans” (COPPES-ZANTINGA & EGELER, 2002).

Na tentativa inicial de estabelecer alguma ordem em um campo de terminologias desordenadas, um grupo de clínicos, patologistas e cientistas se reuniu pela primeira vez em 1985 e, utilizando-se de suas experiências, definiram uma classificação das desordens histiocíticas através de um conjunto de definições e critérios diagnósticos. Surgiu então a *Histiocyte Society*, organização internacional

dedicada ao estudo da Histiocitose. O primeiro grande passo foi separar as desordens das células de Langerhans daquelas relacionadas aos fagócitos mononucleares e das doenças malignas verdadeiras (THE CLINICAL WRITING GROUP OF HISTIOCYTE SOCIETY, 1987). Em 1997, uma nova classificação foi estabelecida pela *Histiocyte Society* em conjunto com membros do Comitê de proliferação de células histiocíticas/reticulares da Organização Mundial de Saúde (WHO). Essa classificação divide as desordens histiocíticas quanto a seu comportamento biológico em dois grupos: o de “natureza reativa” e o de “natureza neoplásica”, dependendo do tipo de célula envolvida: macrófago ou célula dendrítica (grupo de “natureza reativa”) e monócitos (grupo de “natureza neoplásica”). Segundo essa classificação, a HCL é considerada como desordem histiocítica de comportamento biológico variável e relacionada às células dendríticas (FAVARA et al., 1997).

Além de padronizar a nomenclatura, critérios clínicos e patológicos, o trabalho da *Histiocyte Society* também possibilitou a melhora das opções de tratamento através do desenvolvimento de importantes ensaios clínicos prospectivos randomizados e controlados: LCH I (LADISCH et al., 1994; GADNER et al., 2001), LCH II (GADNER et al., 2008) e LCH III – estudo encerrado em fevereiro de 2008 (HISTIOCYTE SOCIETY, 2002).

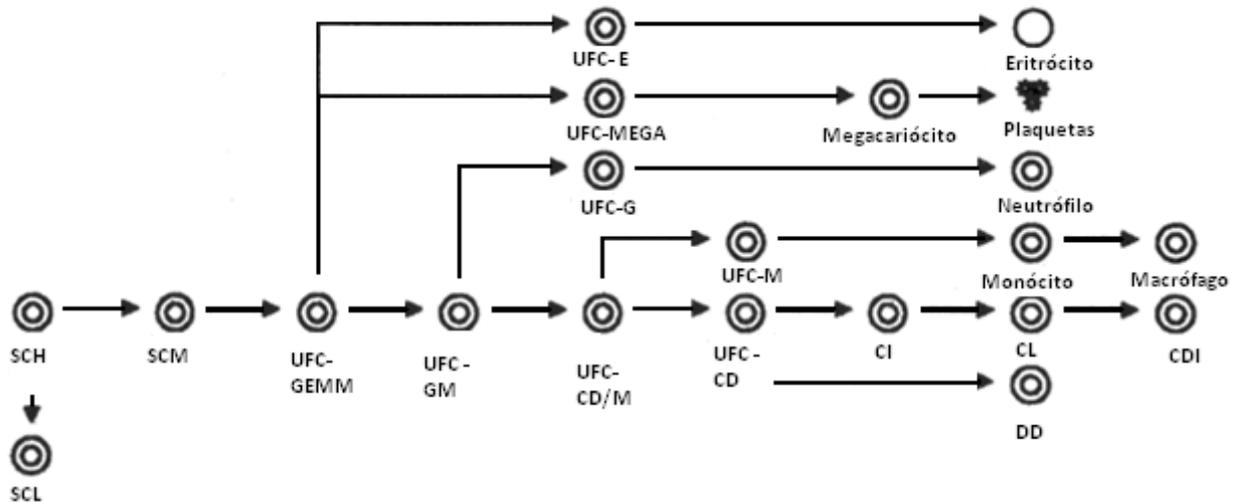
### **3. Célula de Langerhans**

#### **3.1 Origem e diferenciação**

A célula de Langerhans é originária de um progenitor da medula óssea – a célula tronco hematopoiética – comum a todos os demais elementos celulares sanguíneos, como eritrócitos, granulócitos e plaquetas. Na medula óssea, a célula tronco hematopoiética se diferencia em duas linhagens principais – a linfóide e a mielóide. A linhagem mielóide origina as unidades formadoras de colônia (UFCs) de megacariócitos (UFC- mega), de eritrócitos (UFC-E) e de granulócitos/ monócitos (UFC-GM). Esta se diferencia em UFC de granulócitos (UFC-G) e UFC de monócitos e células dendríticas (UFC-MCD). Através de estímulos de citocinas específicas, a UFC-MCD se diferencia em UFC de monócitos (UFC-M) - que origina os monócitos e macrófagos - e UFC de células dendríticas (UFC-CD), responsável pela origem dos dendrócitos

dermais, células indeterminadas, células de Langerhans e células dendríticas interdigitadas (HUANG & ARCECI, 1999; THOMAS & LIPSKY, 1996). A linhagem das células de Langerhans encontra-se representada na **figura 1**.

**Figura 1 - Árvore de linhagem dos histiócitos (HUANG & ARCECI, 1999)**



SCH- *Stem cell* hematopoiética; SCM- *Stem cell* mielóide; SCL- *Stem cell* linfóide; UFC- unidade formadora de colônia; UFC-GEMM- de granulócitos, eritrócitos, megacariócitos e monócitos; UFC-E- de eritrócitos; UFC-MEGA- de megacariócitos; UFC-GM- de granulócitos e monócitos; UFC-G- de granulócitos; UFC-CD/M- de células dendríticas e monócitos; UFC-M- de monócitos; UFC-CD- de células dendríticas; CI- células indeterminadas; CL- células de Langerhans; CDI- células dendríticas interdigitadas; DD- dendrócitos dermais.

As células de Langerhans normais residem primariamente na epiderme, nos epitélios orobucal e vaginal e nos pulmões. Representam 1 a 2% de todas as células epidérmicas. Possuem de 10 a 12  $\mu\text{m}$  de diâmetro e apresentam um formato ondulado e dendrítico único, o que oferece uma larga área de superfície de contato. Esses processos dendríticos formam uma rede que cobre mais de 25% da área de superfície da pele. As células de Langerhans saem da medula óssea e são transportadas pelo sangue periférico para a pele, pulmões, timo e linfonodos. Após sua maturação na pele, migram através dos linfáticos aferentes para os linfonodos regionais (SIEGELMAN, 1997; CHU & JAFFE, 1994; SCHMITZ & FAVARA, 1998).

### 3.2 Função

Os macrófagos desempenham um papel fundamental na fagocitose de grandes partículas de antígenos. Embora também sejam capazes de realizar fagocitose, a principal função das células dendríticas (CDs) é a apresentação de antígenos a linfócitos (ARCECI, 1999; HART, 1997). As células de Langerhans são as CDs apresentadoras de antígenos mais eficientes do corpo (SAVASAN, 2006). Após seu contato com o antígeno, migram pelo sistema linfático da derme para os linfonodos regionais, provavelmente para apresentar os antígenos para as células T paracorticais (SCHMITZ & FAVARA, 1998). Durante esse processo de apresentação de antígenos e ativação, macrófagos e linfócitos secretam uma grande variedade de citocinas que, posteriormente, aumentam sua própria atividade, bem como recrutam outros tipos celulares como granulócitos e eosinófilos (BANCHEREAU & STEINMAN, 1998).

A partir dessas características e funções normais descritas, pode-se prever a variedade de fenótipos possíveis resultantes de uma proliferação e/ou função aberrante de macrófagos ou de células dendríticas. A proliferação desses tipos celulares, aliada ao recrutamento de outras células e liberação de citocinas inflamatórias, resulta em substituição e disfunção dos elementos celulares normais, tumorações, edema, eritema e alteração da resposta imune normal (ARCECI, 1999).

### 3.3 Célula normal *versus* patológica

Estudos sugerem que as células de Langerhans são intrinsecamente anormais na HCL, tanto em aspectos estruturais quanto funcionais. Alguns marcadores apresentam expressão ou padrão de marcação diferente em células normais e células patológicas. A aglutinina de amendoim, por exemplo, apresenta marcação baixa e difusa nas células de Langerhans normais em contraste com uma positividade característica na superfície celular e forte marcação perinuclear, nas células de HCL. A Fosfatase Alcalina Placentária (FAP) pode se expressar apenas transitoriamente nas CLs normais, mas permanece fortemente positiva nas CLs da HCL, o que poderia representar um “fenótipo de ativação” dessas células. A presença do receptor de Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )

nas CLs da HCL, mas não em CLs normais, também poderia representar um “fenótipo de ativação” da CL anormal (ARCECI, 1999).

Durante seu processo normal de maturação, as células de Langerhans diminuem sua capacidade de englobar e processar antígenos e aumentam sua habilidade para apresentá-los. A expressão de moléculas como CD40, CD83, CD86, produtos de complexo principal de histocompatibilidade (MHC) e CCR7 demonstra fenotipicamente essa maturação (RANDOLPH, 2002; BANCHEREAU & STEINMAN, 1998; ANNELS et al., 2003).

As células de Langerhans na HCL não são completamente maduras. Isso é evidenciado por sua maior proliferação, menor eficácia na apresentação de antígenos e uma capacidade migratória sugestiva de parada de maturação em um estado “ativado” (GEISSMANN et al., 2001). As células imaturas expressam receptores de citocinas inflamatórias como CCR6, e apresentam baixos níveis de CD40, CD83 e CD86, entre outros (BANCHEREAU & STEINMAN, 1998).

### **3.4 Histopatologia**

Quando coradas por hematoxilina e eosina e observadas à microscopia óptica, as células de Langerhans apresentam moderada quantidade de citoplasma homoganeamente róseo. O núcleo é usualmente fendido e lobulado, com um padrão de cromatina granular e com um a três pequenos nucléolos (SCHMITZ & FAVARA, 1998).

A lesão básica da HCL contém proporção variável de células de Langerhans patológicas, macrófagos, linfócitos, eosinófilos, células gigantes multinucleadas e, menos comumente, neutrófilos e células plasmáticas. As células de Langerhans da lesão podem estar presentes de forma abundante ou escassa, dependendo do estágio da doença à época da biópsia (FAVARA et al., 1997).

A composição celular da lesão pode ser influenciada pelo local e tempo de evolução da mesma. Lesões mais antigas, principalmente as ósseas, podem exibir aparência paucicelular e fibrótica e as células de Langerhans patológicas podem ser

raras ou ausentes, dificultando o diagnóstico. Fibrose grave e permanente ocorre com frequência em lesões pulmonares e hepáticas de longa duração levando, por vezes, a complicações fatais (SCHMITZ & FAVARA, 1998; FAVARA & JAFFE, 1994).

As células gigantes multinucleadas (CGMs) são originadas da fusão de células de linhagem de monócito/macrófago (ANDERSON, 2000). Estudo com imunofenotipagem sugere que as CGMs presentes em lesões de HCL, tanto em tecidos ósseos quanto em pele e linfonodos, possuem características fenotípicas de osteoclastos e expressam várias enzimas de degradação de matriz óssea, favorecendo a hipótese de um papel destrutivo dessas células nas lesões de HCL (COSTA et al., 2005).

Os eosinófilos podem estar ausentes e não são essenciais para o diagnóstico de HCL. Células plasmáticas, linfócitos B e neutrófilos são raramente encontrados e, aparentemente, não fazem parte da lesão. Linfócitos T são frequentemente encontrados, e há considerável interesse na possibilidade de que essas células sejam a fonte das citocinas relacionadas ao processo de doença (SCHMITZ & FAVARA, 1998).

### **3.4.1 Histopatologia da lesão em órgãos específicos**

#### ***Ossos***

As lesões ósseas típicas são compostas de histiócitos gigantes multinucleados do tipo osteoclasto, com destruição óssea, necrose, hemorragia e abscessos eosinofílicos. A presença de células plasmáticas levanta dúvidas sobre o diagnóstico de HCL ou sugere infecção secundária de uma lesão óssea por HCL. Lesões antigas mostram fibrose e alterações xantomatosas (SCHMITZ & FAVARA, 1998).

#### ***Pele***

Embora o acometimento cutâneo pela HCL possa apresentar-se clinicamente com variados tipos de lesões, as alterações histopatológicas são semelhantes em todas elas. As CLs se agregam na derme papilar, formando múltiplos nódulos ou dispendo-se de forma difusa e “em banda”. Há violação da interface derme-epiderme, com ulceração da epiderme, ocasionalmente. Microabscessos e bolhas podem estar presentes. A orientação dos histiócitos ao redor de estruturas anexiais, usualmente

folículos pilosos, é comum. Os histiócitos se misturam com um número variável de linfócitos T e eosinófilos. Neutrófilos, células plasmáticas e mastócitos raramente estão presentes. Células gigantes multinucleadas também são incomuns (MUNN & CHU, 1998; SCHMITZ & FAVARA, 1998).

A doença de Hashimoto- Pritzker, anteriormente denominada “histiocitose congênita auto-curativa” é uma forma incomum de HCL que se manifesta geralmente no período neonatal, e caracteriza-se pelo acometimento nodular da pele. As lesões afetam a derme profunda, poupam a epiderme e são compostas de agregados nodulares de histiócitos, que podem ser multinucleares. As lesões regredem espontaneamente ao longo de várias semanas ou meses (SCHMITZ & FAVARA, 1998).

### ***Linfonodos e baço***

Nos linfonodos, as lesões são compostas de CLs patológicas e células dendríticas relacionadas, macrófagos, células gigantes multinucleadas, linfócitos T e eosinófilos. Ocasionalmente, os histiócitos da lesão penetram a cápsula nodal e o tecido vizinho, provocando expansão capsular e fibrose. Coleções intra-linfáticas de CLs patológicas são frequentemente encontradas nos vasos localizados fora da cápsula nodal. Em lesões antigas, histiócitos xantomatosos, fibroblastos e proliferação de capilares são encontrados, enquanto histiócitos CD1a positivos e eosinófilos são vistos raramente (SCHMITZ & FAVARA, 1998). São identificados cinco padrões histológicos de acometimento linfonodal: 1) padrão sinusoidal (mais comum); 2) padrão sinusoidal limitado; 3) granulomas epitelióides; 4) destruição parcial e 5) destruição completa da arquitetura do linfonodo (SCHMITZ & FAVARA, 1998).

As lesões de HCL no baço são semelhantes às encontradas em linfonodos, embora com menor quantidade de células gigantes multinucleadas (SCHMITZ & FAVARA, 1998).

### ***Pulmões***

As lesões pulmonares clássicas típicas são compostas de nódulos brancacentos de margens indentadas, medindo de 0,1 a 1 cm de diâmetro e algumas vezes associadas a alterações císticas. O centro das lesões é ocupado por células de

Langerhans circundadas por linfócitos, macrófagos, eosinófilos, fibroblastos e algumas células gigantes. O aspecto morfológico dos nódulos varia de acordo com o estágio de evolução da doença, de infiltração transbronquial por CLs na fase inicial a acúmulo de fibroblastos nas lesões crônicas e cicatrizes em forma de estrela circundadas por áreas císticas no estágio final (SCHMITZ & FAVARA, 1998; De JULI et al., 2007). O diagnóstico é realizado através de biópsia pulmonar. O lavado bronco-alveolar também pode sugerir o diagnóstico, se forem encontrados mais de 5% de células de Langerhans CD1a positivas ou demonstração de grânulos de Birbeck pela microscopia eletrônica (De JULI et al., 2007).

### ***Fígado***

São reconhecidos três padrões histopatológicos distintos para o envolvimento hepático pela HCL. O primeiro, denominado “triadite”, resulta da infiltração inflamatória do trato portal por linfócitos e número variável de neutrófilos e eosinófilos. Nessa lesão, as CLs patológicas usualmente não são demonstradas. No segundo tipo há predominância de células de Kupffer alargadas, padrão interpretado como resultante da ativação dessas células. No terceiro tipo, há infiltração do fígado pelas CLs. Elas se distribuem preferencialmente na região periportal, embora lesões acinares também possam estar presentes de forma concomitante ou isolada. Triadite e lesões inflamatórias podem acompanhar as lesões nodulares por HCL. As lesões hepáticas frequentemente “escapam” à biópsia por agulha, devido à natureza focal do acometimento pela doença nesse órgão (GUTHERY & HEUBI, 2001; SCHMITZ & FAVARA, 1998; FAVARA & JAFFE, 1994). As lesões dos ductos biliares podem evoluir para colangite esclerosante e, em última análise, para cirrose biliar (BRAIER et al., 2002; SCHMITZ & FAVARA, 1998).

### ***Medula óssea***

As CLs não são constituintes normais da medula óssea. O diagnóstico através de aspirado de medula óssea frequentemente é inconclusivo, devido à infiltração focal pelas lesões. Quando presentes em tais amostras, as CLs patológicas se apresentam de forma isolada ou em grupos na periferia. À biópsia de medula óssea, as lesões se apresentam de forma focal e são compostas primariamente por CLs patológicas,

neutrófilos, eosinófilos, linfócitos, células gigantes multinucleadas e, raramente, abscessos eosinofílicos. Podem ocorrer fibrose focal e alterações xantomatosas na medida em que as lesões evoluem, em casos tratados ou não (SCHMITZ & FAVARA, 1998).

### ***Sistema nervoso central***

As lesões da HCL no SNC são muito variadas, raramente semelhantes às de outros sítios, e as células de Langerhans podem estar ausentes (SCHMITZ & FAVARA, 1998).

Grois e colaboradores (GROIS et al., 2005) revisaram as amostras de biópsia cerebral de 12 pacientes com HCL. Três tipos de lesões foram identificados:

1. Granulomas circunscritos ao espaço de tecido conectivo cerebral – apresentam composição similar aos granulomas de HCL nos órgãos periféricos, com presença variável de células CD1a positivas à imunohistoquímica e considerável infiltração por células T.
2. Granulomas localizados nos espaços de tecido conectivo cerebral, com infiltração parcial do parênquima cerebral por células de Langerhans CD1a positivas - esse padrão foi associado com evidente infiltrado inflamatório por células T e grave neurodegeneração, caracterizada por perda quase total de neurônios e axônios, além de gliose.
3. Lesões neurodegenerativas sem infiltração por células CD1a positivas, afetando principalmente cerebelo e tronco cerebral – nesse tipo de lesão, foi identificado processo inflamatório intenso, associado à degeneração tecidual, ativação microglial e gliose.

### ***Trato gastrintestinal***

Lesões tumorais no estômago, intestino delgado e intestino grosso têm sido relatadas. No trato gastrintestinal, as lesões características de HCL ocupam a lâmina própria e submucosa. Há atrofia glandular e da mucosa, com possível erosão. A atrofia de vilosidades também pode estar presente (SCHMITZ & FAVARA, 1998).

### 3.5 Imuno-histoquímica

Embora macrófagos e células dendríticas apresentem algumas características em comum durante o processo de determinação de linhagem e diferenciação, eles se divergem não somente em suas características funcionais, mas também quanto a seus marcadores celulares. O marcador de superfície CD68 presente em macrófagos não é usualmente visualizado na maioria das células dendríticas. Em contrapartida, células dendríticas e particularmente CLs usualmente expressam o antígeno de superfície CD1a. Outra característica única de todas as CLs e de algumas células dendríticas é a presença dos grânulos de Birbeck (ARCECI, 1999). Os marcadores imuno-histoquímicos dos histiócitos encontram-se representados na **tabela 1**.

#### ***Neuroproteína S100 e aglutinina de amendoim***

Embora não seja um marcador que confira certeza diagnóstica, a neuroproteína S100 é comumente utilizada e, quando associada a outros marcadores, permanece útil na avaliação das desordens histiocíticas. Pode ser positiva nas células de Langerhans, células indeterminadas e células dendríticas interdigitadas, além de macrófagos ativados em linfonodos reativos, macrófagos envolvidos na síndrome hemofagocítica e na doença de Rosai-Dorfman (FAVARA et al., 1997).

A aglutinina de amendoim apresenta marcação densa na superfície celular e região paranuclear das células de HCL, quando segue o padrão característico (McLELLAND & CHU, 1988). Mas esse padrão nem sempre é observado (YANG, 1992).

#### ***CD1a***

Os antígenos humanos da família CD1 (*“cluster of differentiation 1”*) são glicoproteínas de superfície celular expressas em tímócitos imaturos, células de Langerhans epidermais e em uma população de linfócitos B (PORCELLI et al., 1989; ZAJONC et al., 2003). Há cinco tipos de CD1: CD1a, CD1b, CD1c, CD1d e CD1e (ZAJONC et al., 2003), e o *locus* gênico para sua codificação está localizado no cromossomo 1 (PORCELLI et al., 1989).

Antígenos de composição proteica necessitam ser clivados e ligados a proteínas de MHC classe I ou II para que possam ser apresentados e reconhecidos pelas células T

(MOODY et al., 1999). As proteínas da família CD1 se ligam a uma variedade de antígenos lipídicos e glicolipídicos para que possam ser apresentados às células T (ZAJONC et al., 2003; MOODY et al., 1999; HUNGER, et al., 2004; SIELING et al., 1995; MOODY et al., 2000, MOODY et al., 1997). Cada tipo de lipídio se liga especificamente a uma das isoformas de CD1a (SIELING et al., 1995; MOODY et al., 2000; MOODY et al., 1997).

Estudos demonstram que a isoforma CD1a pode se ligar a antígenos não somente exógenos, mas também endógenos, o que poderia indicar seu envolvimento com o sistema autoimune (ZAJONC et al., 2003). Recentemente, a expressão de CD1a foi relatada em células epiteliais no esôfago de Barret (CAPELLO et al., 2003) e no câncer de mama *in situ* (HILLENBRAND et al., 1999; La ROCCA et al., 2004). A hipótese de que o CD1a estaria envolvido na resposta imune antitumoral através da apresentação de antígenos lipídicos do tumor às célula T tem sido investigada (COVENTRY & HEINZEL, 2004).

O antígeno de superfície CD1a pode ser detectado por imuno-histoquímica em tecidos congelados e suspensão de células preparadas a partir de epiderme (FITHIAN et al., 1981). O anticorpo monoclonal 010 detecta o antígeno CD1a em material embebido em parafina (KRENÁCS et al., 1993, JEAN-FRANÇOIS et al., 1995) e seu valor no diagnóstico da HCL foi confirmado (SCHMITZ & FAVARA, 1998).

### ***Langerina***

Estudos de Valladeu e colaboradores em 1999 e 2000 (VALLADEAU, et al., 1999; VALLADEAU, et al., 2000) permitiram a identificação de um novo tipo de marcador das CLs denominado Langerina (CD207). Através desses estudos, foi demonstrado pela primeira vez que a Langerina é um tipo de lecitina tipo II cálcio-dependente localizada na membrana celular, expressa exclusivamente pelas CLs, cujo gene é mapeado no cromossomo 2p13. A Langerina induz à sobreposição das membranas das CLs sobre si mesmas o que leva, em última análise, à formação dos grânulos de Birbeck. Funcionaria como um receptor endocítico para translocar o ligante da superfície celular para o interior dos grânulos de Birbeck (VALLADEAU, et al., 1999; VALLADEAU, et al., 2000).

A seletividade da expressão de Langerina pelas CLs, demonstrada por Valladeau e colaboradores, tem sido usada por outros pesquisadores como um meio efetivo de identificar CLs em espécimes teciduais (HUNGER et al., 2004; SÉGUIER et al., 2003). Estudos demonstram que, semelhantemente às CLs normais, as CLs na HCL também exibem um alto nível de expressão de Langerina e que sua positividade na HCL pode ser detectada com uma sensibilidade diagnóstica comparável à do CD1a (CHIKWAVA & JAFFE, 2004; DZIEGIEL et al., 2007; GEISSMANN et al., 2001; SHOLL et al., 2007; LAU, CHU, & WEISS, 2008) e especificidade discretamente menor, podendo ser usada em conjunto, ou alternativamente ao CD1a, para confirmação do diagnóstico definitivo de HCL, principalmente nos casos em que o diagnóstico é suspeito, mas não pode ser confirmado devido à negatividade do CD1a (LAU, CHU, & WEISS, 2008).

**Tabela 1 – Marcadores dos Histiócitos por técnicas de imuno-histoquímica e microscopia eletrônica** (SCHMITZ & FAVARA, 1998)

Marcador	CL	CI	CDI	CLP	DD	M
CD1a	+	+	-	+	-	-
S-100	+	+	+	+	-	-†
Fator XIIIa‡	-	-	-	-	+	-
Fasciína‡	-	?	+	-	+	-
CD68	-	-	-	-	+	+
Grânulos de Birbeck	+	-	-	+	-	-

\* Deste grupo de estudos imuno-histoquímicos, todos podem ser feitos em tecidos processados em parafina com anticorpos disponíveis comercialmente (com exceção da fasciína). †Pode ser positiva sob certas condições de ativação; ‡Necessários estudos adicionais

CL= Célula de Langerhans; CI= Célula Indeterminada; CDI= Célula Dendrítica Interdigitada; CLP= Célula de Langerhans Patológica; DD= Dendrócito Dermal; M= Macrófago

### 3.6 Microscopia eletrônica

Os grânulos de Birbeck (GBs) são organelas citoplasmáticas pentalamelares de comprimento variável (aproximadamente 200 – 400nm) e largura uniforme de aproximadamente 33nm. Possuem uma aparência de “raquete de tênis” constituídos por duas membranas sobrepostas separadas por “pequenas folhas” com estriações periódicas do tipo “zipper” (“*zipper-like*”) (ARCECI, 1999; VALLADEAU, et al., 2000).

São descritas duas possíveis origens para os grânulos de Birbeck. A primeira seria do aparelho de Golgi, associada a uma função secretória, sugerida pela localização intracelular dos GBs. A segunda origem, mais provável, seria a partir da membrana celular, via endocitose mediada por receptores. Essa via sugere que, através da fagocitose de porções da citomembrana, os GBs poderiam permitir o sequestro de antígenos, internalizando-os de forma ativa. Após essa internalização, os antígenos ficariam estocados em um microambiente protegido de degradação até que as células de Langerhans recebessem sinais para ativação e migração apropriadas (VALLADEAU, et al., 2000).

Os grânulos de Birbeck são a única propriedade específica das células de Langerhans. Sua demonstração através da microscopia eletrônica foi, por muito tempo, considerada como “padrão-ouro” para o diagnóstico de HCL (FAVARA et al., 1997). No entanto, o número de células de Langerhans na lesão de HCL em que os grânulos de Birbeck podem ser visualizados varia de 2% a 69% (SCHMITZ & FAVARA, 1998). Além disso, o diagnóstico da HCL através de microscopia eletrônica (ME) é frequentemente difícil, devido a material insuficiente ou inadequadamente fixado, o que afeta os resultados do estudo por ME. A técnica de imuno-histoquímica é mais simples e rápida, requer apenas microscopia óptica, é menos dispendiosa financeiramente e seu valor no diagnóstico definitivo foi confirmado (DZIEGEL et al., 2007; HISTIOCYTE SOCIETY, 2009).

#### 4. Epidemiologia

A HCL pode apresentar-se em qualquer idade, do período neonatal à velhice, embora seja mais frequente em crianças. Mais de 50% dos casos são diagnosticados entre um e quinze anos de idade (BHATIA et al., 1997). O pico de incidência situa-se na faixa etária de um a três anos (CARTENSEN & ORNVOLD, 1993; NICHOLSON et al., 1998; HENTER et al., 2004; ARCECI, 1999).

Poucos estudos sobre a incidência de HCL foram publicados até o momento; alguns em nível nacional (MÜLLER et al., 2006; CARTENSEN & ORNVOLD, 1993; GUYOT-GOUBIN et al., 2008), outros em nível regional (ALSTON et al., 2007; STALEMARK et al., 2008). Neles, a incidência estimada da doença, em número de casos por milhão de crianças por ano, variou em torno de 2,2 (MÜLLER et al., 2006; ALSTON et al., 2007) a 8,9 (STALEMARK et al., 2008). Estudo dinamarquês demonstrou incidência de 5,4 (CARTENSEN & ORNVOLD, 1993), compatível com recente estudo francês cuja incidência encontrada foi de 4,6 (GUYOT-GOUBIN et al., 2008) e com um britânico, com incidência de 4.1 casos/milhão de crianças/ ano (SALOTTI et al., 2009). Acredita-se que a incidência da doença seja, de forma geral, subestimada devido à semelhança das formas localizadas com outras doenças e à possibilidade de regressão espontânea (ARICÒ & EGELER, 1998).

A HCL é ligeiramente mais comum em meninos do que em meninas (1.2 – 2:1) (HENTER et al., 2004; ARCECI, 1999; SALOTTI et al., 2009). Estudo suíço demonstrou aparente sazonalidade, sendo a maioria dos casos (22 dos 29) diagnosticados nos períodos de outono e inverno (STALEMARK et al., 2008), o que não foi verificado em estudo inglês prévio, envolvendo um total de 111 casos (ALSTON et al., 2007).

#### 5. Etiologia

A etiopatogênese da HCL permanece desconhecida. Mecanismos imunológicos, neoplásicos, virais e outros têm sido exaustivamente pesquisados e a interpretação desses estudos é fonte de controvérsia até o presente momento.

## 5.1 Fatores de risco

Possíveis fatores de risco relacionados à HCL têm sido pesquisados. Exposição a infecções, radiação, drogas ou medicamentos durante o período intrauterino ou na infância, além de aspectos sócio-econômicos são comumente investigados.

Estudo de Hamre e colaboradores (HAMRE et al., 1997) encontrou associação da HCL com infecção do trato urinário materno durante a gravidez (RR=2,64), além de problemas alimentares (RR=2,44), uso de medicação (RR= 4,66) e transfusão sangüínea (RR=12,1) durante os primeiros seis meses de vida. Com relação à história familiar, a presença de tumores benignos foi o único fator de risco identificado (RR= 2,07). Não houve associação com os demais fatores pesquisados.

Bhatia e colaboradores não confirmaram as associações descritas no estudo anterior (BHATIA et al., 1997). As seguintes associações foram estatisticamente significativas: infecções no período neonatal e HCL multissistêmica (OR=2,2), exposição a solventes e HCL unissistêmica (OR= 54,9), vacinação na infância (OR= 0,4), presença de doença tireoidiana no paciente (OR=21,6) e história familiar de doença tireoidiana (OR= 1,4). Com relação à exposição a solventes, acetona foi o produto encontrado na maioria dos casos. As infecções neonatais poderiam estar relacionadas tanto ao processo da doença quanto a uma possível etiologia da HCL. A associação com doença tireoidiana no próprio paciente poderia ser explicada, em parte, pelo envolvimento da hipófise pela HCL, o que foi demonstrado pela diminuição do risco relativo quando foram excluídos da análise os pacientes com doença tireoidiana e *diabetes insipidus*. Por outro lado, a associação de HCL com doença tireoidiana no paciente e em outros membros da família poderia sugerir uma etiologia imune para a doença.

## 5.2 Herança genética

Alguns estudos sugerem que alterações genéticas poderiam desempenhar um papel na patogênese da doença. Aricò e colaboradores (ARICÒ & DANESINO, 2001) mostraram alta taxa de concordância da doença entre gêmeos idênticos (86%) em comparação com gêmeos dizigóticos (12%). A ocorrência de HCL em familiares do paciente é relatada em cerca de 1% dos casos (HENTER et al., 2004), mas há pouca

evidência sugerindo um forte componente genético para seu desenvolvimento (NICHOLSON et al., 1998; SCHMITZ & FAVARA, 1998).

### 5.3 Sistema imune

As lesões de HCL são compostas de várias células do sistema imune como macrófagos, linfócitos e eosinófilos, sugerindo que a doença poderia ser imunologicamente mediada. Estudos sugerem que uma produção aberrante ou sem controle de citocinas poderia desempenhar um papel nas desordens histiocíticas (SCHMITZ & FAVARA, 1998; KANNOURAKIS & ABBAS, 1994). A HCL poderia resultar ainda de um bloqueio na transição entre a resposta imune inata, responsável pela mobilização imediata das células locais de defesa, e a resposta imune adaptativa, mais específica e “refinada” que a anterior (NEZELOF & BASSET, 2004).

### 5.4 Origem tumoral *versus* inflamatória

Uma das maiores controvérsias com relação à etiopatogenia da HCL seria sua possível natureza neoplásica, inflamatória ou ambas (EGELER et al., 2004).

O principal argumento favorável à hipótese de uma origem neoplásica foi a demonstração de que as células de Langerhans na HCL são monoclonais em todos os estágios da doença (WILLMAN et al., 1994; YU et al., 1994; WILLMAN, 1994). Outros argumentos seriam a detecção de anormalidades cromossômicas no granuloma eosinofílico (BETTS et al., 1998) e a efetividade clínica de certas drogas antimitóticas para seu tratamento.

Há alguns argumentos contrários à origem tumoral. A clonalidade, por si só, não seria justificativa para se considerar a HCL como neoplasia, visto que algumas condições clínicas benignas também são clonais (FADEEL & HENTER, 2003). Histologicamente, as lesões de HCL são granulomatosas, em oposição à característica de homogeneidade e “monotonia” de uma lesão neoplásica. Além disso, algumas formas da doença podem apresentar remissão espontânea, o que não seria esperado em uma neoplasia não tratada (NEZELOF & BASSET, 2004).

## 5.5 Infecções

A hipótese de que respostas imunes estariam envolvidas na etiopatogenia da HCL levaram os pesquisadores a investigarem possíveis estímulos de agentes infecciosos, principalmente vírus, para essa resposta (NICHOLSON et al., 1998).

Vírus patogênicos comuns como adenovírus, citomegalovírus (CMV), Espstein-Barr vírus (EBV), Herpes Simples vírus (HSV), Herpes vírus humano tipo 6 (HHV-6), Parvovírus (PV), vírus linfotrópico humano I e II (HTLV I e II) e vírus da imunodeficiência humana (HIV) continuam sendo pesquisados como possíveis agentes relacionados à etiologia da HCL (WILLMAN & McCLAIN, 1998). Leahy e colaboradores (LEAHY et al., 1993) relataram o encontro de HHV-6 na maioria das amostras de biópsia de pacientes com lesões ósseas únicas e com doença multissistêmica, usando reação de cadeia de polimerase (PCR). McClain e colaboradores (McCLAIN et al., 1994) estudaram 56 casos de HCL utilizando hibridização *in situ* e PCR. Não foi evidenciado genoma dos vírus: CMV, adenovírus, EBV, HSV, HHV-6, HIV, HTLV I e II e parvovírus. Sakata e colaboradores (SAKATA et al, 2007) relataram o caso de um paciente de um ano de idade com diagnóstico de EBV crônica ativa que desenvolveu massa orbital secundária à HCL, um ano após diagnóstico de EBV.

A maioria dos autores concorda, no entanto, que não é possível estabelecer uma relação causal entre vírus e HCL. Em estudo recente com 83 pacientes portadores de HCL e 236 controles ajustados por idade não houve diferença entre prevalência, títulos sorológicos e taxas virais de EBV, CMV e HHV-6 entre os grupos (JEZIORSKI et al., 2008).

## 6. Classificação

Ao longo dos anos, o crescente entendimento da etiopatogenia da doença possibilitou inúmeros avanços no estudo da HCL. A normatização da nomenclatura foi fundamental para o desenvolvimento de grandes estudos cooperativos internacionais que uniformizaram critérios para o diagnóstico, estadiamento e resposta ao tratamento, permitindo a comparação entre diversos estudos e a consequente

melhora no manejo da doença. Esses critérios, publicados pela *Histiocyte Society* inicialmente em 1987 (THE CLINICAL WRITING GROUP OF HISTIOCYTE SOCIETY, 1987) e revisados em 1997 (FAVARA et al., 1997) são descritos a seguir.

### 6.1 Nomenclatura

Os termos granuloma eosinofílico do osso, Doença de Letterer-Siwe, Doença de Hand-Shüller-Christian, Doença de Hashimoto-Pritzker, histiocitose autocurativa (“*self-healing histiocytosis*”), histiocitose cutânea pura, granulomatose de células de Langerhans, histiocitose tipo II, reticuloendoteliose não lipídica e Histiocitose X expressam as várias manifestações clínicas de uma mesma doença – a Histiocitose de células de Langerhans – devendo, portanto, ser abolidos (THE CLINICAL WRITING GROUP OF HISTIOCYTE SOCIETY, 1987).

### 6.2 Células de origem das desordens histiocíticas

A classificação proposta inicialmente pela *Histiocyte Society* (THE CLINICAL WRITING GROUP OF HISTIOCYTE SOCIETY, 1987) dividia as histiocitoses em três grupos: a classe I correspondia à histiocitose de células de Langerhans; classe II às histiocitoses de outros fagócitos mononucleares que não células de Langerhans (linfocitoses hemofagocíticas, doença de Rosai-Dorfman, xantogranuloma, reticulo-histiocitoma e “miscelâneas”) e classe III correspondendo às desordens malignas dos histiócitos.

Atualmente, as desordens histiocíticas são classificadas quanto às células de origem da doença e quanto ao padrão de comportamento da mesma, sendo revogada a classificação descrita acima. Desse modo, são divididas em desordens de comportamento biológico variado e desordens malignas. Cada um desses grupos é dividido quanto às células de origem, que podem ser macrófagos ou células dendríticas. A HCL é considerada uma desordem histiocítica de comportamento biológico variável e relacionada às células dendríticas, mais especificamente, células de Langerhans (FAVARA et al., 1997). Essa classificação encontra-se expressa na **tabela 2**.

**Tabela 2 – Classificação contemporânea das desordens histiocíticas** (FAVARA et al, 1997)

---

Desordens de comportamento biológico variado

- Relacionadas a células dendríticas
  - Histiocitose de células de Langerhans
  - Processos secundários a células dendríticas
  - Xantogranuloma Juvenil e desordens relacionadas
  - Histiocitomas solitários de fenótipos variados de células dendríticas
- Relacionadas a macrófagos
  - Síndromes hemofagocíticas
    - Linfohistiocitose Hemofagocítica Primária (familiar e esporádica: comumente iniciadas por infecções virais)
    - Síndromes hemofagocíticas secundárias
      - Associadas a infecções
      - Associadas a doenças malignas
      - Outras
  - Doença de Rosai-Dorfman (Histiocitose sinusal com linfadenopatia maciça)
  - Histiocitoma solitário com fenótipo de macrófago

Desordens malignas

- Relacionadas a monócitos
    - Leucemias (Classificação FAB e FAB revisada)
      - Leucemia monocítica M5 a e b
      - Leucemia mielomonocítica aguda M4
      - Leucemia mielomonocítica crônica
    - Tumor ou sarcoma monocítico extramedular (similar monocítico do sarcoma granulocítico)
  - Sarcoma histiocítico relacionado a células dendríticas (localizado ou disseminado)
    - Fenótipo específico: célula dendrítica folicular, célula dendrítica interdigitada, etc
  - Sarcoma histiocítico relacionado a macrófagos (localizado ou disseminado)
-

### 6.3 Critérios diagnósticos

De acordo com a *International Histiocyte Society*, o diagnóstico é considerado **presuntivo** quando a histologia das lesões é característica, **provável** quando, além de microscopia óptica sugestiva, duas das seguintes reações histoquímicas encontram-se positivas: proteína S100, manosidase, ATPase ou lecitina de amendoim. O diagnóstico é considerado **definitivo** apenas se, associado à histologia característica, houver positividade para o antígeno de superfície CD1a à imuno-histoquímica ou for demonstrada a presença de grânulos de Birbeck nos histiócitos à microscopia eletrônica (THE CLINICAL WRITING GROUP OF HISTIOCYTE SOCIETY, 1987).

## 7. Diagnóstico diferencial

A possibilidade de acometimento de qualquer órgão e com intensidade variável abre um grande leque de diagnósticos diferenciais para a doença. Assim, dermatite seborreica de difícil controle e otorreia crônica podem ser sinais de HCL, e não somente entidades clínicas isoladas. Essa característica de “variabilidade” é, inclusive, a responsável por grande número de diagnósticos errôneos ou tardios da doença.

O diagnóstico diferencial histológico da HCL é feito, principalmente, com outras desordens histiocíticas (de macrófagos ou células dendríticas), malignas ou não. As principais doenças que podem ser confundidas com a HCL são descritas a seguir.

### 7.1 Xantogranuloma juvenil

É a doença mais frequentemente confundida com a HCL. A manifestação clínica mais comum é a de uma lesão cutânea papulosa firme, única, com telangiectasia superficial. Embora seja menos comum, a ocorrência de múltiplas lesões, com envolvimento sistêmico grave, também é possível (NEWMAN et al., 2007).

A célula de origem da lesão é o dendrócito dermal (FAVARA et al., 1997). Histologicamente, é evidenciada infiltração difusa da derme papilar e reticular, constituída de pequenos histiócitos, células gigantes de Touton e células espumosas.

Pode ocorrer extensão para o tecido subcutâneo, fáscia e músculos periféricos. Os histiócitos são positivos para CD68, Fator XIIIa e vimentina e negativos para S100 (**tabela 1**). Usualmente, são negativos para CD1a, mas há relatos de casos positivos (NEWMAN et al., 2007).

## 7.2 Síndromes hemofagocíticas

São desordens relacionadas à ativação inapropriada de macrófagos. Podem ser primárias (origem familiar) ou secundárias a processos como infecções, defeitos imunológicos, doença de Chediak-Higashi, artrite reumatóide e doenças malignas. Podem ser graves e fatais, sendo indicado transplante de medula óssea na síndrome familiar (FAVARA et al., 1997; HENTER et al., 1991; HENTER et al., 2007). Histologicamente, são evidenciadas proliferação de histiócitos, hemofagocitose e fagocitose de plaquetas na medula óssea, linfonodos e outros órgãos viscerais. A depleção de linfócitos em linfonodos, baço e timo é característica (NEWMAN et al., 2007).

Os critérios definidos pela *Histiocyte Society* para o diagnóstico das síndromes hemofagocíticas são: febre sem outra causa definida, esplenomegalia, citopenias, hipofibrinogenemia ou hipertrigliceridemia e hemofagocitose demonstrada na medula óssea, baço, linfonodo ou outro tecido (HENTER et al., 1991). Em revisão feita em 2004, os cinco critérios acima foram mantidos e outros três foram adicionados: presença de atividade de células *Natural Killer* (NK) baixa ou ausente; hiperferritinemia; e altos níveis de receptor solúvel de IL-2. Ao todo, cinco dos oito critérios devem ser preenchidos para que o diagnóstico seja realizado (HENTER et al., 2007).

## 7.3 Doença de Rosai-Dorfman

É uma desordem histiocítica policlonal, também conhecida como “histiocitose sinusal com linfadenopatia maciça”. Clinicamente, é caracterizada por aumento maciço de linfonodos, principalmente cervicais. Em menos de 10% dos pacientes ocorre o

envolvimento de linfonodos em outras localizações. O acometimento extranodal ocorre em aproximadamente 40% dos pacientes, podendo ocorrer hepatoesplenomegalia leve, perda de peso, *rash* cutâneo, febre e lesões ósseas, entre outros. Na maioria das vezes possui curso indolente, mas de bom prognóstico. Evolui para regressão espontânea em 20% dos casos, mas em 50% deles, a doença permanece estável e persistente por vários anos (HENTER et al., 2004 ; Mc CLAIN et al., 2004).

A célula da doença é de origem desconhecida, mas possui características semelhantes ao macrófago ativado (FAVARA et al., 1997). Histologicamente, é evidenciada expansão dos seios linfonodais por histiócitos espumosos e plasmócitos, além de fibrose importante da cápsula. Os histiócitos são fortemente positivos para S100, e negativos para CD1a (NEWMAN et al., 2007; HENTER et al., 2004).

#### **7.4 Doenças malignas relacionadas a monócitos**

São incluídas no grupo de desordens histiocíticas malignas, visto que as células de origem dessas doenças (monócitos) são precursoras de histiócitos. São raras e o diagnóstico pode ser desafiador em dois sentidos: provar a natureza maligna da doença e provar que a célula de origem é um histiócito (FAVARA et al., 1997). As características sugestivas de malignidade são: presença de anormalidades citogenéticas clonais, aneuploidia, achados clínicos e histológicos sugestivos de doença maligna e alta taxa de proliferação celular (FAVARA et al., 1997). À histologia, é evidenciada proliferação de células largas e atípicas, com citoplasma basofílico e vacuolado, e núcleo largo e irregular. Figuras de mitose são frequentes e áreas de necrose podem estar presentes. A distribuição característica das células neoplásicas se faz pela infiltração da região sinusoidal dos linfonodos (GOGUSEV & NEZELOF, 1998). A positividade de marcadores como S100, lisozima, Ki-M8, Ki-M4, CD21 e CD35 é sugestiva de etiologia histiocítica (FAVARA et al., 1997).

## 8. Manifestações clínicas

A história natural da HCL é muito variável. Em alguns casos, apresenta curso clínico agudo e fulminante, em outros se comporta como uma doença recorrente e crônica, havendo, ainda, casos em que ocorre remissão espontânea (THE CLINICAL WRITING GROUP OF THE HISTIOCYTE SOCIETY, 1989). Qualquer órgão / sistema do corpo pode ser acometido, mas os principais são ossos, pele e linfonodos (ARICÒ & EGELER, 1998).

Quanto ao número de órgãos acometidos, as manifestações clínicas são divididas em unissistêmicas (apenas um órgão/ sistema ) ou multissistêmicas (mais de um órgão / sistema acometido). As manifestações unissistêmicas podem ser ainda unifocais (lesão isolada em um único órgão) ou multifocais (múltiplas lesões em um único órgão ou sistema). As multissistêmicas podem estar relacionadas a acometimento de órgãos de risco (fígado, baço, pulmões, sistema hematopoiético), grupo esse de pior prognóstico (FAVARA et al., 1997).

As manifestações clínicas serão descritas por órgão de acometimento, conforme se segue.

### 8.1 Ossos

A manifestação clínica mais comum da HCL é o acometimento ósseo. As lesões são osteolíticas e os principais ossos acometidos são, em ordem decrescente, crânio, ossos longos, costelas, vértebras e pelve (ARICÒ & EGELER, 1998). Podem ser únicas (doença unissistêmica unifocal) ou múltiplas (doença óssea multifocal), e podem ainda estar associadas ao acometimento de outros órgãos, fazendo parte de uma doença multissistêmica. A lesão óssea unifocal é a de melhor prognóstico, podendo evoluir para cura espontânea ou após biópsia excisional (GHANEM et al., 2003; SARTORIS & PARKER, 1984). A doença óssea multifocal possui baixa mortalidade, mas é associada a altas taxas de reativação e sequelas (TITGEMEYER et al., 2001; JUBRAN et al., 2005, KILPATRICK et al., 1995, HOWART et al., 1999).

A queixa mais comum é de edema doloroso no local da lesão, mas, dependendo do sítio acometido, podem ocorrer complicações como proptose, na lesão de ossos da órbita, e colapso ósseo em caso de lesão de ossos vertebrais. (ARICÒ & EGELER, 1998; AZOUZ et al., 2005). O envolvimento da mastóide pode levar à otite persistente e refratária ao tratamento. A destruição dos ossículos pode levar à surdez (ARICÒ & EGELER, 1998; SURICO et al., 2000). Quando localizadas em alguns sítios específicos como ossos da face ou da fossa craniana anterior e média (temporal, esfenoidal, etmoidal, zigomático, orbital), com extensão intracraniana do tumor, há um aumento de 3 vezes no risco de desenvolvimento de *diabetes insipidus* (HISTIOCYTE SOCIETY, 2002).

A radiografia permanece como o exame de escolha para avaliação das lesões ósseas. Ao exame, aparecem como lesões osteolíticas únicas ou múltiplas de margem irregular. Esclerose periférica é considerada como um sinal inicial de cura (ARICÒ & EGELER, 1998; AZOUZ et al., 2005). A cintilografia ao diagnóstico e para acompanhamento usualmente revela os sítios de atividade da doença, especialmente no envolvimento ósseo múltiplo (AZOUZ et al., 2005), mas não é indicada como rotina (HISTIOCYTE SOCIETY, 2002). A tomografia computadorizada é mais indicada nos casos em que for necessário o estudo de detalhes da lesão óssea e a ressonância magnética é útil para avaliação de envolvimento de tecidos moles (AZOUZ et al., 2005). A experiência com Tomografia por Emissão de Pósitrons (PET-SCAN) ainda é limitada, mas estudo de Binkovitz e colaboradores (BINKOVITZ et al., 2003) com três casos mostrou que, com o uso do PET-SCAN, todas as lesões ósseas em atividade foram identificadas. Além disso, foi possível a diferenciação entre lesões em atividade e lesões curadas, sendo a normalização das lesões, ao PET-SCAN, mais precocemente visualizada que à radiografia ou cintilografia. Estudo de Phillips e colaboradores (PHILLIPS et al., 2009) avaliou 44 pacientes com HCL submetidos ao PET-SCAN e exames radiológicos convencionais. De modo geral, o PET-SCAN detectou 35% mais lesões de ossos e tecidos moles que as radiografias convencionais, cintilografia, RNM ou TC. Especificamente para detecção de lesões na coluna vertebral, o método não foi sensível e a RNM foi claramente superior. Os autores sugerem que o PET-SCAN seria benéfico para triagem de pacientes com lesões em um único sítio, sem suspeita de

acometimento de coluna vertebral, devendo ser realizado ao diagnóstico e para avaliação da resposta ao tratamento (PHILLIPS et al., 2009). Há relato de que a ressonância magnética de corpo inteiro poderia ser útil na identificação de lesões ósseas não detectáveis à radiografia, além de lesões extraósseas (GOO et al., 2006), mas seu uso não é rotineiramente indicado.

## 8.2 Pele

O envolvimento cutâneo é observado em mais de um terço das crianças com HCL, de forma isolada (10% dos casos) ou em associação a lesões de outros órgãos (ARICÒ & EGELER, 1998). As regiões mais comumente afetadas são o crânio, as zonas intertriginosas, região lombo-sacral e genitália externa (MUNN & CHU et al., 1998). O envolvimento das unhas é raro e, na maioria dos casos, está associado à doença multissistêmica (MATAIX et al., 2008). A morfologia clínica das lesões é muito variável, podendo apresentar-se como máculas, petéquias, pápulas, nódulos, úlceras, crostas, vesículas e, até, dermatite generalizada. Dermatite seborreica de difícil tratamento também é um sinal comum da doença (ARICÒ & EGELER, 1998). O acometimento cutâneo isolado é de bom prognóstico, e o tratamento pode ser local (excisão, corticóide tópico, psoraleno, mostarda nitrogenada) ou sistêmico (corticóide, radioterapia, quimioterapia) (MUNN & CHU, 1998). A doença pode, ainda, evoluir para cura espontânea, mas as possibilidades de reativação e de evolução para doença multissistêmica são indicações para que esses pacientes recebam acompanhamento de longo prazo (MUNN & CHU, 1998; BATEY & SAMAYOA, 2002). A “Histiocitose congênita autocurativa” ou “Doença de Hashimoto-Pritzker” é uma forma rara de acometimento cutâneo por HCL, de início no período neonatal, cujas lesões são eruptivas e nodulares, semelhantes às da varicela. Qualquer parte do corpo pode ser afetada, incluindo palmas das mãos e solas dos pés (MUNN & CHU, 1998). É usualmente benigna e de curso clínico autolimitado, mas há possibilidade de reativações, devendo o paciente ser acompanhado por longo prazo (LONGAKER et al., 1994).

### 8.3 Linfonodos

Aumento de um ou mais linfonodos (doença unissistêmica nodal) pode ser a única manifestação de HCL. Mais frequentemente, no entanto, a linfadenopatia acompanha o acometimento de outros sítios e é componente da doença multissistêmica (FAVARA & JAFFE, 1994). A linfadenomegalia também pode ocorrer nas regiões adjacentes às lesões ósseas ou cutâneas sem que haja, necessariamente, acometimento do linfonodo pela doença (ARICÒ & EGELER, 1998).

Os principais linfonodos acometidos são os cervicais, e seu aumento pode ser maciço (ARICÒ & EGELER, 1998), inclusive com acometimento mediastinal (KHADILKAR et al., 2008). Recente relato apresenta o caso de uma recém-nascida de 2 semanas com massa cervical congênita de crescimento para o mediastino, que consistia de linfonodos acometidos pela doença, sem outras manifestações (TANTIWONGKOSI et al., 2008).

### 8.4 Órgãos de risco

O acometimento do fígado, baço, pulmões ou sistema hematopoiético é considerado de risco na HCL e pacientes com envolvimento de um ou mais desses órgãos apresentam pior prognóstico.

#### *Fígado e baço*

Hepatomegalia é muito comum na doença multissistêmica. Pode ser causada por infiltração do órgão pelas células de Langerhans ou por linfadenomegalia periportal maciça, levando à hepatomegalia colestática. Quando persistente, esse processo pode levar à colestase, colangite, fibrose e cirrose biliar (ARICÒ & EGELER, 1998). Esplenomegalia é encontrada em aproximadamente 5% dos casos ao diagnóstico e, na doença refratária, pode contribuir para as citopenias (ARICÒ & EGELER, 1998).

### ***Sistema hematopoiético***

A presença de pancitopenia é comum em pacientes com doença multissistêmica, mas na maioria desses casos, não é demonstrada infiltração da medula óssea por CLs patológicas (ARICÒ & EGELER, 1998). Considera-se infiltração somente se forem evidenciadas células CD1a positivas nas amostras de medula óssea (HISTIOCYTE SOCIETY, 2002).

### ***Pulmões***

O acometimento pulmonar isolado é mais frequente em adultos e raro nas crianças, embora seja relatado (VALLIANI et al., 2009; BRAIER et al., 2007). Na faixa etária adulta, é considerado como uma entidade clínica especial, muito relacionada ao tabagismo e desenvolvimento de neoplasias. Nas crianças, o envolvimento pulmonar é mais frequentemente observado na doença multissistêmica. Pode manifestar-se por tosse, taquidispneia, retrações, pneumotórax e evoluir para doença respiratória crônica ou, em última análise, para insuficiência respiratória. As alterações radiológicas são variáveis, desde infiltração intersticial difusa até visualização de múltiplos cistos e pneumotórax. Testes de função respiratória estão usualmente alterados. O diagnóstico pode ser realizado por lavado bronco-alveolar, com pesquisa de células CD1a positivas, ou por biópsia pulmonar (ARICÒ & EGELER, 1998; DE JULI et al., 2007).

## **8.5 Trato gastrintestinal**

O envolvimento do trato gastrointestinal (TGI) é incomum, mas pode manifestar-se por vômitos, diarreia e má-absorção. O diagnóstico é feito por biópsia das lesões (ARICÒ & EGELER, 1998).

## **8.6 Alterações endócrinas**

O *diabetes insipidus* (DI) é a endocrinopatia mais prevalente na HCL e, dentre todas as doenças que podem causar *diabetes insipidus* (DI) central, a HCL é a mais comum (PROSCH et al., 2004). Pode ocorrer tanto como primeira manifestação clínica

quanto anos após o diagnóstico ou mesmo término do tratamento da doença e é a principal causa de sequelas permanentes na HCL (HAUPT et al., 2004). Os pacientes com lesões ósseas cranianas apresentam maior risco de desenvolverem DI (ARICÒ & EGELER, 1998). O diagnóstico é realizado através do teste de privação hídrica e o acometimento da hipófise pode ser visualizado à ressonância magnética através do espessamento de sua haste e perda do sinal do brilho posterior (ARICÒ & EGELER, 1998). O tratamento sistêmico da HCL não previne o desenvolvimento de DI.

A deficiência de hormônio do crescimento é a segunda endocrinopatia mais comum e está associada, com frequência, à presença de DI. Estudo retrospectivo com 589 pacientes mostrou que as crianças tratadas com hormônio de crescimento tiveram altura final significativamente maior que as não tratadas, embora permanecessem abaixo da altura final esperada para a família. Não houve influência da administração do hormônio na atividade da doença (DONADIEU et al., 2004).

O hipotireoidismo é outra manifestação da doença, secundária ao acometimento hipofisário (ARICÒ & EGELER, 1998). A infiltração da glândula tireóide pela HCL foi relatada em pequeno número de casos (ARICÒ & EGELER, 1998; LOLLAR et al., 2008).

## **8.7 Sistema nervoso central**

Virtualmente qualquer parte do SNC pode ser afetada. Os sinais e sintomas dependem do local acometido e podem estar presentes ao diagnóstico, mas usualmente aparecem vários anos após (MARTIN-DUVERNEUIL et al., 2006). As alterações radiológicas (ressonância magnética, tomografia computadorizada) também podem preceder as manifestações clínicas em vários anos (WNOROWSKI et al., 2008). Clinicamente, quatro grupos de pacientes podem ser identificados (GROIS et al., 1998; PRAYER et al., 2004; BARTHEZ et al., 2000; WNOROWSKI et al., 2008):

1. Envolvimento do eixo hipotálamo-hipofisário - é a lesão do SNC mais frequente, sendo DI sua principal manifestação.

2. Doença neurodegenerativa – é o segundo tipo de lesão mais encontrado, sendo a região pontina-cerebelar a mais acometida. Os sintomas podem variar desde distúrbios súbitos de comportamento e dificuldade de aprendizagem até sintomas graves como ataxia, disartria ou disfagia. Nenhum agente ou estratégia terapêutica específica mostrou eficácia comprovada para o tratamento desses pacientes.
3. Lesões com efeito de massa: podem ser resultantes de lesões subjacentes ósseas, meníngeas ou do plexo coróide. Os sintomas dependem do tamanho e local da lesão e incluem cefaléia, vômitos, papiledema, atrofia do nervo óptico, convulsões e outros sinais focais. A excisão cirúrgica é, por vezes, ao mesmo tempo diagnóstica e terapêutica.
4. Combinação das manifestações anteriores.

A *Histiocyte Society*, através de seu grupo de estudos de HCL em SNC, desenvolveu protocolo com o objetivo de uniformizar um programa de diagnóstico e coletar informações sobre a evolução desses pacientes para posteriores avaliações – o LCH CNS (HISTIOCYTE SOCIETY, 2003).

## 9. Estadiamento

O estadiamento da HCL é baseado no número de órgãos ou sistemas envolvidos, número de sítios afetados e na presença ou não de disfunção desses órgãos. Os protocolos de tratamento da *Histiocyte Society* (LADISCH et al., 1994; GADNER et al., 2001, GADNER et al., 2008) categorizam a HCL em dois estadios, conforme se segue:

1. Doença unissistêmica – caracterizada pelo envolvimento de um único órgão ou sistema. É classificada como 1A quando o acometimento é de um único sítio e 1B quando múltiplos sítios de um mesmo órgão são acometidos.
2. Doença multissistêmica – quando mais de um órgão ou sistema são envolvidos.

Pacientes que apresentam linfonodos aumentados secundários à lesão óssea ou cutânea subjacente, ou lesões cutâneas restritas aos locais de acometimento ósseo ou linfonodal, são considerados como tendo doença em um único sistema (BROADBENT et al., 1994).

Egeler e D'Angio (EGELER & D'ANGIO, 1995) sugerem ainda a classificação da doença em “restrita” ou “extensa, com ou sem disfunção de órgãos”. Os critérios dessa classificação encontram-se na **tabela 3**.

A presença de disfunção de órgãos é um fator prognóstico mais importante que o número de órgãos acometidos (ARICÒ & EGELER, 1998). Os critérios de disfunção de órgãos de risco foram definidos por Lahey (LAHEY, 1975) e são utilizados nos estudos cooperativos internacionais (HISTIOCYTE SOCIETY, 2002). São eles:

1. Disfunção hepática - presença de uma ou mais das seguintes alterações: hipoproteinemia, edema, ascite, hiperbilirrubinemia.
2. Disfunção pulmonar – presença de tosse, taquipneia, dispneia ou ambos, cianose, pneumotórax ou derrame pleural, excluídas causas infecciosas e atribuíveis à doença de base.
3. Disfunção do sistema hematopoiético – presença de uma ou mais das seguintes alterações:
  - anemia (Hb < 10 g/dL ou < 9 g/dL em crianças), excluídas causas como ferropenia e infecção;
  - leucopenia (contagem de leucócitos menor que 4000), ou
  - trombocitopenia (contagem de plaquetas menor que 100.000).

A presença de número excessivo de CLs no aspirado de medula óssea não é, por si só, considerada evidência de disfunção. O envolvimento da medula óssea (M.O) é definido se forem evidenciadas células CD1a positivas no esfregaço. Hipocelularidade, hemofagocitose, mielodisplasia e/ou mielofibrose devem ser considerados como fenômenos secundários.

A doença pulmonar isolada do adulto, devido a características peculiares como forte associação com tabagismo e doenças malignas, é considerada como uma variante da HCL, não sendo incluída na classificação anterior (FAVARA et al., 1997).

**Tabela 3- Categorização dos pacientes com HCL de acordo com a extensão da doença (EGELER, 1995)**

- 
1. Histiocitose de células de Langerhans restrita
    - a. *Rash* cutâneo confirmado por biópsia sem qualquer outro sítio envolvido
    - b. Lesões ósseas únicas, com ou sem *diabetes insipidus*, envolvimento linfonodal adjacente ou *rash* cutâneo
    - c. Lesões ósseas múltiplas, consistindo de lesões em vários ossos ou mais de duas lesões em um único osso, com ou sem *diabetes insipidus*, envolvimento linfonodal adjacente ou *rash* cutâneo
  2. Histiocitose de células de Langerhans extensa
    - a. Envolvimento orgânico visceral, com ou sem lesões ósseas, *diabetes insipidus*, envolvimento linfonodal adjacente, e/ ou *rash* cutâneo, mas *sem* sinais de disfunção de quaisquer dos seguintes órgãos: pulmão, fígado ou sistema hematopoiético.
    - b. Envolvimento orgânico visceral com ou sem lesões ósseas, *diabetes insipidus*, envolvimento linfonodal adjacente, e/ ou *rash* cutâneo, mas *com* sinais de disfunção de quaisquer dos seguintes órgãos: pulmão, fígado ou sistema hematopoiético.
- 

O LCHIII, estudo da *Histiocyte Society*, cujos resultados ainda não foram publicados, estratifica os pacientes em três grupos (HISTIOCYTE SOCIETY, 2002):

1. Pacientes com doença multissistêmica e envolvimento de um ou mais órgãos de risco (fígado, baço, pulmões, sistema hematopoiético).
2. Pacientes com doença multissistêmica, mas sem envolvimento de órgãos de risco.
3. Pacientes com doença unissistêmica com envolvimento ósseo multifocal ou envolvimento em “sítios especiais”, com risco de acometimento de sistema nervoso central (SNC), como lesões de tecido mole com extensão intracraniana ou lesões vertebrais com extensão de tecido mole para o compartimento intra-espinhal.

Os pacientes com envolvimento pulmonar único e os demais pacientes com doença unissistêmica, sem envolvimento de “sítios especiais” ou doença óssea multifocal foram excluídos do estudo.

## 10. Critérios de avaliação clínica e laboratorial

Com o propósito de uniformizar o manejo da avaliação inicial das crianças com HCL, a *Histiocyte Society* definiu critérios de avaliação clínica e laboratorial para esses pacientes (THE CLINICAL WRITING GROUP OF THE HISTIOCYTE SOCIETY, 1989). Ao diagnóstico, deve ser pesquisada a história completa, incluindo a possível presença de dor, irritabilidade, perda de apetite, febre, poliúria e polidipsia, diarreia e hipoatividade. Um exame físico completo deve ser realizado, incluindo medidas de temperatura, peso, altura e perímetro cefálico, quando indicado. Deve ser dada atenção especial para a caracterização de *rashes* cutâneos na pele e couro cabeludo, presença de púrpura, sangramento, otorreia, anormalidades orbitárias, linfadenopatia, lesões de gengiva e palato, dentição, edema em regiões ósseas, dispneia, taquipneia, retrações intercostais, tamanho do fígado e do baço, edema, ascite e icterícia. Na avaliação neurológica, devem ser pesquisados anormalidades de nervos cranianos, papiledema e disfunção cerebelar. Essa avaliação completa deve ser realizada a cada consulta.

Os exames laboratoriais e radiológicos são divididos em dois tipos: 1) os de avaliação basal mínima, que devem ser realizados em todos os casos; e 2) os realizados sob indicações específicas. Avaliação imunológica, incluindo quantificação de imunoglobulinas séricas e função de células T, embora de interesse para pesquisa, não são indicados de forma rotineira. Os exames indicados, bem como o intervalo recomendado para sua realização, encontram-se resumidos nas **tabelas 4 e 5**.

**Tabela 4 – Avaliação laboratorial e radiológica indicada para novos pacientes com HCL**

(THE CLINICAL WRITING GROUP OF THE HISTIOCYTE SOCIETY, 1989)

Exame	Intervalos de acompanhamento dos exames se:			Lesão óssea única
	Alterado	Inalterado		
<b>Hemograma completo</b>	Mensal	A cada 6 meses	6	Repetição desnecessária
<b>Coagulograma</b>	Mensal	A cada 6 meses	6	Repetição desnecessária
<b>Testes de função hepática (* AST, ALT, FA, Bilirrubinas, Proteínas total e frações</b>	Mensal	A cada 6 meses	6	Repetição desnecessária
<b>Radiografia tórax (PA e perfil)</b>	Mensal	A cada 6 meses	6	Repetição desnecessária
<b>Radiografia de crânio e ossos longos</b>	A cada 6 Meses †	Repetição desnecessária		Uma vez, após 6 meses
<b>Testes de privação de líquidos</b>	A cada 6 meses	A cada 6 meses	6	Repetição desnecessária

\* AST – Aspartato aminotransferase; ALT – Alanina aminotrasferase; e FA – Fosfatase alcalina

†o protocolo LCH III recomenda a repetição ao final das seis primeiras semanas de tratamento e a cada três meses após o término do tratamento, até aparecerem sinais de resolução

**Tabela 5 – Avaliação sob indicações específicas (HISTIOCYTE SOCIETY, 2002)**

<b>Indicação</b>	<b>Exame</b>
Radiografia de tórax alterada, taquipneia, retrações intercostais	TC alta resolução  Testes de função pulmonar, se apropriados para a idade
Pacientes com TC alta resolução alterada: para diagnóstico de envolvimento pulmonar isolado ou para excluir infecção	Biópsia pulmonar  Lavado bronco-alveolar
Diarreia crônica inexplicável ou evidência de má-absorção	Biópsia endoscópica
Disfunção hepática: para diferenciar atividade da doença de colangite	Ultrassonografia  Biópsia hepática
Anormalidades visuais ou neurológicas	RM encefálica  Avaliação neurológica, testes psicológicos
Poliúria, polidipsia, baixa estatura, síndromes hipotalâmicas, galactorreia, puberdade precoce ou tardia	Avaliação endócrina incluindo teste de privação de água, testes dinâmicos da hipófise anterior, RM
Envolvimento da gengiva, perda dentária	Radiografia panorâmica dos dentes e TC da mandíbula e maxila, consulta com dentista
Otorreia, surdez	Consulta com otorrinolaringologista, audiometria, RM do encéfalo

## 11. Avaliação da resposta ao tratamento

A atividade da doença é avaliada de acordo com os critérios empregados pela *Histiocyte Society* em seus ensaios clínicos (GADNER et al., 2001; GADNER et al., 2008).

São eles:

1. Doença inativa:
  - Resolução de todos os sinais e sintomas, sem evidência de doença
2. Doença em atividade
  - Doença em regressão: regressão dos sinais e sintomas
  - Doença estável: persistência de sinais e sintomas, sem novas lesões
  - Doença em progressão: progressão dos sinais e sintomas e/ou aparecimento de novas lesões. Na doença óssea isolada, a progressão é definida como o aparecimento de novas lesões ósseas ou lesões em outros órgãos.

A resposta precoce, avaliada à sexta semana de tratamento é um importante fator prognóstico. Pacientes que não apresentam resposta, quando avaliados nesse período, têm um risco aumentado de falha terapêutica e podem necessitar de tratamento diferenciado. (MINKOV et al., 2000; GADNER et al., 2001; GADNER et al., 2008). Os critérios de resposta utilizados encontram-se na **tabela 6**.

**Tabela 6 – Sistema de escore do Protocolo de Histiocitose de Células de Langerhans (LCH) III da *Histiocyte Society* (HISTIOCYTE SOCIETY, 2002)**

Categorias de resposta		
<b>Melhor</b>	Resolução Completa	Doença inativa
	Regressão	Doença ativa em regressão continuada
<b>Intermediária</b>	Estável	Persistência dos sinais e sintomas
	Mista	Novas lesões em alguns sítios, regressão em outros
<b>Pior</b>	Progressão*	

\* Na doença óssea isolada, a progressão é definida como o aparecimento de novas lesões ósseas ou lesões em outros órgãos

Algumas críticas são feitas a esse sistema de classificação. Ele é semiquantitativo, parcialmente subjetivo, e cada avaliação é baseada na situação antes e após o tratamento (ou com intervalo de seis semanas). Donadieu e colaboradores (DONADIEU, PIGUET et al., 2004) sugeriram um sistema de classificação mais objetivo para avaliar a atividade da doença (**tabela 7**). A taxa de mortalidade em cinco anos foi de 1% para pacientes com escore inicial de 0 a 2; 4.4% para escore de 3 a 6 e 43.4% para pacientes com escore inicial maior que 6. Persistência ou aumento do escore à sexta semana foi altamente preditivo de morte entre pacientes com escores iniciais maiores que seis. Nos pacientes com escores baixos ou moderados ao diagnóstico, a persistência do escore não teve impacto significativo na evolução vital.

**Tabela 7- Escore clínico para atividade de doença na HCL (DONADIEU, PIGUET et al., 2004)**

Variável	Modalidade	Escore
Osso (a)	Dor	1
	Sem dor	0
Osso (b)	Compressão de outros órgãos (órbita ou coluna)	2
	Sem compressão	0
Febre (>38.5°C)	Sim	1
	Não	0
Pulmão: estudos de imagem	Pneumotórax	2
	Lesão intersticial à radiografia ou tomografia de tórax	1
	Radiografia ou tomografia de tórax normais	0
Pulmão: função	Ventilação mecânica ou testes de função pulmonar (TFP) > 50%	5
	Oxigênio suplementar ou TFP entre 50 e 80%	2
	Sem disfunção, sem cianose, sem oxigênio suplementar	0
Pele: área	25%	2
	5-25%	1
	Menos de 25%	0

Variável	Modalidade	Escore
Tumor de tecido mole (incluindo SNC)	Diâmetro máximo de 5cm	2
	Diâmetro máximo de 2 a 5cm	1
	Diâmetro máximo de 0 a 2cm	0
Linfonodos (> 2cm)	Sim	1
	Não	0
Fígado	Abaixo umbigo	2
	Aumentado, acima do umbigo	1
	Não aumentado	0
Baço	Abaixo umbigo	2
	Aumentado, acima do umbigo	1
	Não aumentado	0
Fígado (enzimas)	> 10 vezes o valor de referência superior para a idade	2
	3 a 10 vezes o valor de referência superior para a idade	1
	< 3 vezes o valor de referência superior para a idade	0
Fígado (gama GT)	> 10 vezes o valor de referência superior para a idade	2
	3 a 10 vezes o valor de referência superior para a idade	1
	< 3 vezes o valor de referência superior para a idade	0
Albumina	Necessária infusão na última semana	3
	Sem necessidade de infusão, mas <30 g/L	1
	>30 g/L	0
Plaquetas: necessidade na última semana	Mais de duas transfusões	4
	1 ou 2 transfusões	3
	Plaquetopenia, sem necessidade de transfusão	2
	Contagem de plaquetas normal	0
Hemácias: necessidade na última semana	Mais de 2 unidades	4
	1 ou 2 unidades	3
	Hemoglobina abaixo de 10 g/dL, sem necessidade de transfusão	1
	Sem transfusão	0

## 12. Tratamento

Devido à característica diversidade do curso clínico, variando de remissão espontânea à doença progressiva fatal, as opções de tratamento da HCL também foram inúmeras ao longo dos anos. Atualmente, após unificação dos critérios de classificação da doença (THE CLINICAL WRITING GROUP OF HISTIOCYTE SOCIETY, 1987; FAVARA et al., 1997), ensaios clínicos prospectivos e randomizados têm sido desenvolvidos e o tratamento foi adaptado de acordo com determinados grupos reconhecidos como de risco. Assim, o manejo das formas uni e multissistêmica apresenta características diferentes, que serão apresentadas a seguir.

### 12.1 Doença unissistêmica

A maioria dos pacientes com HCL (aproximadamente 60%) apresenta a forma unissistêmica. Ossos, pele e linfonodos são os locais mais frequentemente envolvidos. Os pacientes com doença unissistêmica apresentam evolução benigna e, usualmente, tratamentos locais como curetagem, aplicação intralesional de corticóides ou tratamento com irradiação - para o acometimento ósseo - e excisão cirúrgica no acometimento linfonodal, são suficientes para o controle da doença. Na forma cutânea o curso clínico é mais imprevisível, podendo evoluir para cura espontânea ou progressão, com necessidade de tratamento sistêmico (TITGEMEYER et al., 2001).

A maioria dos estudos indica que a doença óssea unifocal poderia ser manejada através de conduta expectante ou de medidas locais, mas que a doença óssea multifocal deveria ser tratada com quimioterapia devido à ocorrência de frequentes reativações e sequelas permanentes (LADISCH et al., 1994; GADNER et al., 2008; MINKOV et al., 2000; HISTIOCYTE SOCIETY, 2002). A sobrevida global dos pacientes com doença unissistêmica chega a 100% (TITGEMEYER et al., 2001; MORIMOTO et al., 2006, CECI et al., 1993). Foi demonstrado impacto positivo da quimioterapia na frequência de reativações, que variou de 18% (TITGEMEYER et al., 2001) a 28,1% (MORIMOTO et al., 2006), em contraste com a anteriormente relatada pela literatura em torno de 50% (DIMENTBERG & BROWN, 1990; SESSA et al., 1994). Os estudos DAL-HX encontraram alta frequência de sequelas permanentes (25% para todos os

pacientes com HCL unissistêmica e 44% na doença óssea multifocal), embora tenham sido devidas, em sua maioria, a problemas ortopédicos relacionados aos sítios de lesão (TITGEMEYER et al., 2001).

O estudo da *Histiocyte Society* - LCH III - tem como um de seus objetivos avaliar o impacto da quimioterapia por seis meses na redução de reativações e sequelas nos pacientes com doença óssea multifocal. (HISTIOCYTE SOCIETY, 2002) A admissão de pacientes no estudo foi encerrada e de acordo com o último relatório da *Histiocyte Society*, dos 556 pacientes com doença unissistêmica admitidos no estudo até agosto de 2007, 221 apresentavam doença óssea multifocal e 171 doença em “sítios especiais” como ossos do crânio, face e vértebras além de acometimento de tecidos moles. A realização de análise dos resultados ainda é prematura e dados dos pacientes registrados continuam sendo coletados (HISTIOCYTE SOCIETY, 2008).

## 12.2 Doença multissistêmica

Ao longo dos anos, grupos cooperativos internacionais têm estudado possíveis esquemas de tratamento para os pacientes com HCL multissistêmica, com objetivo de reduzir mortalidade, reativações e sequelas da doença. A comparação entre esses trabalhos também possibilitou o reconhecimento de subgrupos de risco que se beneficiariam de tratamento específico, além de dar origem a outras pesquisas, atualmente em andamento. Os principais estudos serão detalhadamente apresentados a seguir.

### *Grupo Francês*

Através da cooperação de 32 instituições de hematologia e oncologia da França, o grupo francês para estudo da HCL (THE FRENCH LANGERHANS' CELL HISTIOCYTOSIS STUDY GROUP, 1996) realizou um estudo retrospectivo no período de 1983 a 1993. Nesse período foram diagnosticados 348 casos de HCL. Destes, 108 (31%) apresentavam doença óssea isolada uni ou bifocal, 136 (39%) apresentavam envolvimento de tecido mole sem disfunção de órgãos e 37 (11%) apresentavam essa disfunção. O tratamento nesse período foi extremamente variável, impedindo

comparações, mas os principais agentes empregados foram vimblastina (VMB) com ou sem corticosteróides e etoposideo (VP-16). A sobrevida global foi de 91,7% e a frequência de sequelas foi de 21,9%. Os fatores de mau prognóstico identificados foram má evolução inicial e disfunção de órgãos. A idade inferior a um ano ao diagnóstico não pareceu ser um fator independente para prognóstico ruim.

### ***Grupo Italiano***

O AIEOP-CNR-H.X 83 (CECI et al., 1993) foi um estudo cooperativo de 12 instituições italianas, realizado no período de junho de 1983 a dezembro de 1988. Noventa pacientes com diagnóstico presuntivo de HCL foram divididos em dois grupos: o de bom prognóstico, cujos pacientes apresentavam doença uni ou multissistêmica, mas sem disfunção orgânica (n=79), e o de mau prognóstico, com disfunção orgânica (n=11, todos com doença multissistêmica). A análise dos resultados, em relação ao tratamento, foi possível em 84 dos 90 pacientes.

No grupo de bom prognóstico, os 16 pacientes que apresentavam lesão única receberam apenas tratamento local e 59 receberam imunoterapia (extrato tímico) e/ou monoterapia com VMB. Os pacientes que não apresentaram resposta à VMB receberam doxorubicina (ADM) e, caso mantivessem ausência de resposta, VP-16. Os pacientes de mau prognóstico receberam ciclos de quatro semanas com vincristina, doxorubicina (ADM), ciclofosfamida e prednisona, por um total de nove ciclos.

A sobrevida global foi de 100% para o grupo de bom prognóstico e de 45,5% para o de mau prognóstico. As taxas de resposta completa para imunoterapia, VMB, ADM e VP-16 foram de 10%, 62,9%, 42,8% e 88,2%, respectivamente. O estudo concluiu que o principal fator de mau prognóstico, com relação à sobrevida, foi disfunção orgânica. A idade inferior a dois anos e doença multissistêmica sem disfunção de órgãos não seriam, necessariamente, fatores de mau prognóstico. Os pacientes de bom prognóstico poderiam beneficiar-se da monoterapia e os de mau prognóstico apresentariam altas taxas de mortalidade, apesar de poliquimioterapia intensiva.

## **DAL-HX**

DAL-HX 83 (GADNER et al., 1994) e DAL-HX 90 (MINKOV et al., 2000) foram dois estudos consecutivos realizados pelo grupo alemão *Deutsche Arbeitsgemeinschaft für Leukaemieforschung* (DAL) no período de junho de 1983 a fevereiro de 1991. Ambos foram multicêntricos (62 diferentes instituições da Áustria, Alemanha, Suíça e Holanda), prospectivos e não-randomizados, e tiveram como objetivo estudar o melhor tratamento para a HCL multissistêmica. Em 2000, o grupo revisou os dados anteriores desses estudos, classificando os pacientes retrospectivamente de acordo com os critérios de estadiamento e resposta ao tratamento definidos pela *Histiocyte Society* (MINKOV et al., 2000).

Originalmente, a HCL disseminada havia sido definida como presença de múltiplas lesões da doença, com qualquer tipo de combinação. Os pacientes com doença disseminada foram divididos em três grupos: A – portadores de lesões esqueléticas multifocais; B – qualquer envolvimento de tecidos moles, com ou sem lesões ósseas, mas sem sinais de disfunção orgânica; e C – presença de disfunção orgânica, segundo critérios de Lahey (LAHEY, 1975).

Dos 324 pacientes incluídos nesses estudos, 138 haviam sido classificados como portadores de HCL disseminada. Após classificação segundo os critérios da *Histiocyte Society*, apenas 63 dos 138 pacientes foram considerados como portadores de doença multissistêmica. A mediana de idade foi de 11,5 meses e a de tempo de observação foi de 7 anos e 6 meses (MINKOV et al., 2000).

O esquema de tratamento de ambos os estudos foi baseado em QT de indução por seis semanas e manutenção por um ano, utilizando combinação de drogas como prednisona (PDN), VMB e VP-16 para indução, além de 6-MP para a manutenção. Pequenas modificações foram realizadas do primeiro para o segundo estudo e as drogas, doses e esquemas terapêuticos encontram-se representadas na **figura 2**.

Trinta e oito dos 63 pacientes foram tratados de acordo como braço B do protocolo (28 no DAL-HX 83, 10 no DAL-HX 90) e 25 de acordo com o braço C (19 no DAL-HX 83 e 6 no DAL-HX 90). A resposta melhor à sexta semana (resposta completa

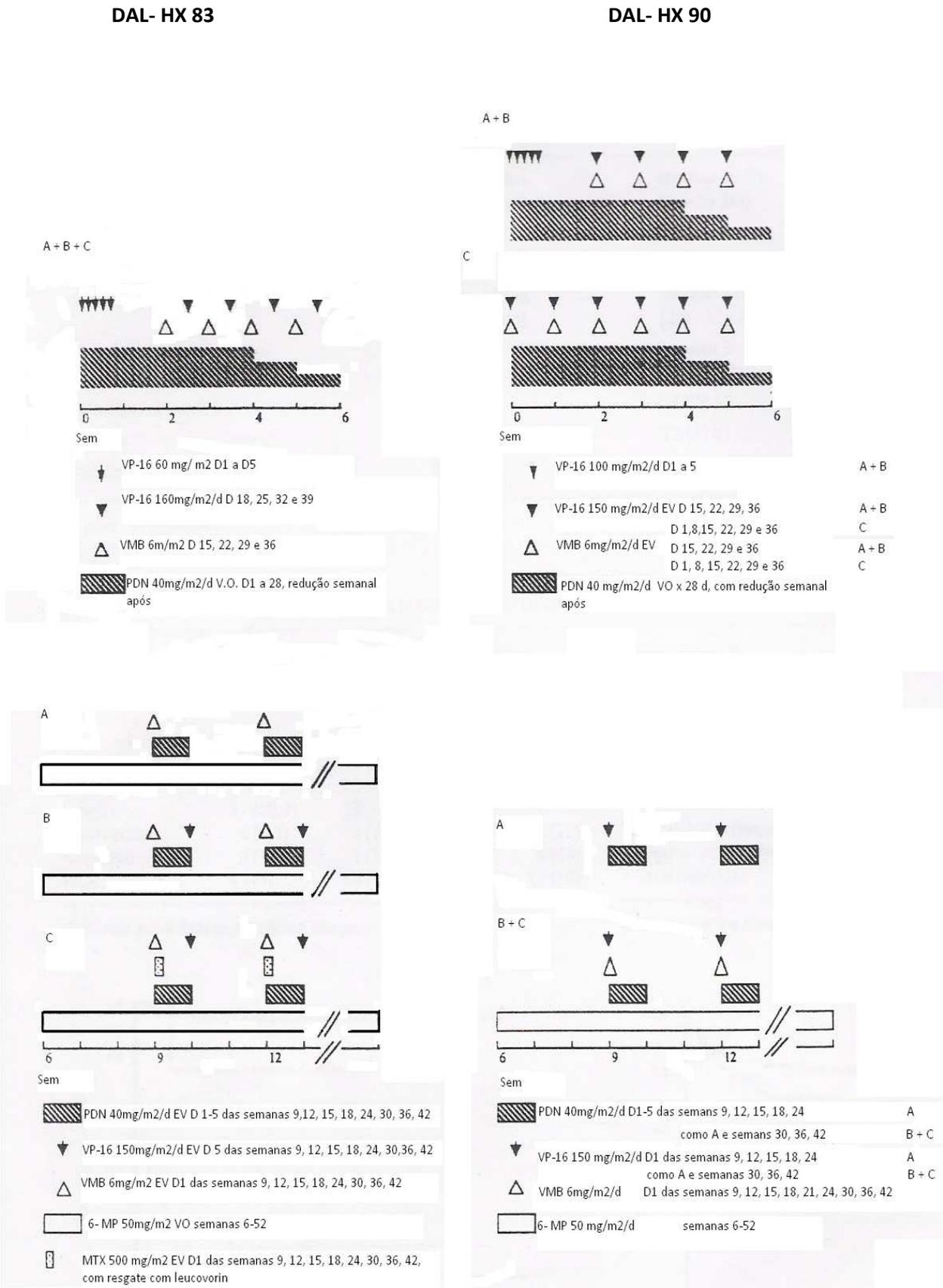
ou regressão continuada da doença) foi observada em 79% dos pacientes. O curso de reativação crônica sem resolução completa foi observado em um paciente e doença progressiva com evolução fatal ocorreu em 12 pacientes (19%). A sobrevida global em cinco anos foi de 81%. A taxa de reativação foi de 30% e sequelas permanentes foram observadas em 38% dos casos.

Os autores concluíram que a resposta à sexta semana de tratamento mostrou clara distinção entre respondedores e não-respondedores e que, quando relacionada à sobrevida, essa resposta parecia ser um importante fator prognóstico na HCL multissistêmica (MINKOV et al., 2000).

### ***Grupo Japonês***

O JLSG- 96 (MORIMOTO et al., 2006) foi um estudo prospectivo, não-randomizado, realizado pelo Grupo de estudos de HCL japonês no período de 1996 a 2001. Os pacientes com HCL multifocal (n= 91) foram divididos em dois grupos: doença unissistêmica (n=32) e doença multissistêmica (n=59). Todos os pacientes foram tratados de acordo com o protocolo A, que consistia de indução por seis semanas com citarabina (Ara-C), vincristina (VCR) e prednisolona (PSL), seguido de manutenção por seis meses. O tratamento dos pacientes com resposta ruim (ausente ou com progressão da doença) foi modificado para o protocolo B, que usou doxorubicina, ciclofosfamida, VCR e PSL. Após uma mediana de acompanhamento de 5 anos, a sobrevida global foi de 94,4%, a taxa de reativações foi de 45,3% e a taxa de resposta foi de 78% para os pacientes com doença multissistêmica. Os pacientes com envolvimento de órgãos de risco tiveram taxa de resposta inicial mais baixa que os sem acometimento, no entanto, a sobrevida global e incidência de reativações foram semelhantes entre os pacientes com ou sem acometimento de órgãos de risco. O estudo encontrou baixa taxa de mortalidade (5,1%), menor que nos estudos DAL-HX e LCH I e os autores concluíram que a alta taxa de reativação poderia ser atribuída ao menor tempo de duração (7,5 meses *versus* 12 meses no DAL-HX), o que será analisado no próximo estudo do grupo, o JLSG-02.

Figura 2: Esquemas de tratamento dos estudos DAL-HX 83 e DAL-HX 90 (MINKOV et al. , 2000)

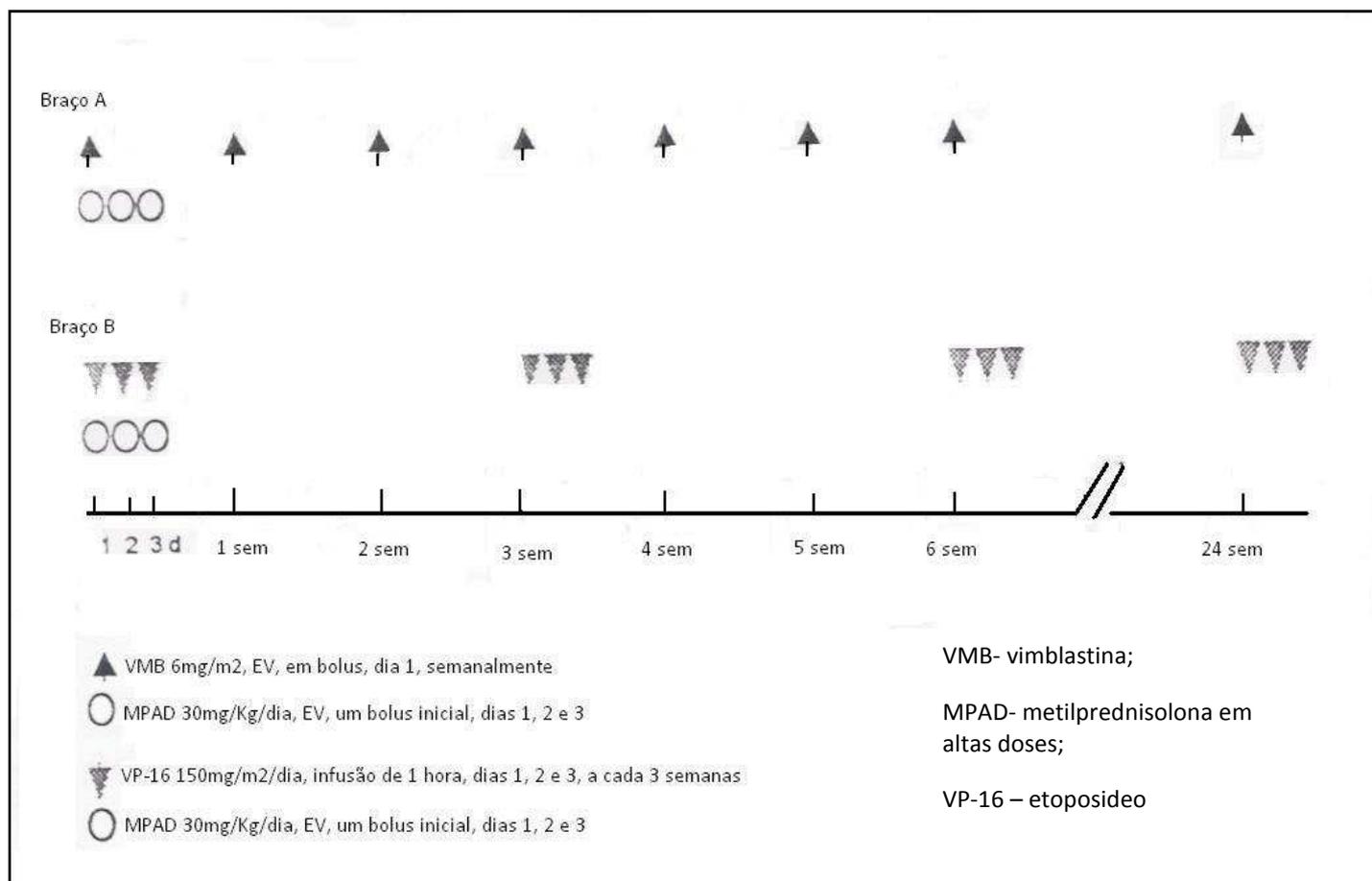


**LCH I**

Iniciado em Abril de 1991, foi o primeiro ensaio clínico multicêntrico, prospectivo e randomizado para o tratamento da HCL multissistêmica (GADNER et al., 2001). Teve como objetivo comparar a monoterapia com vimblastina (VMB) *versus* etoposídeo (VP-16) administrados por um tempo total de seis meses, com relação à resposta, falha de tratamento e morbidade. A resposta foi avaliada na sexta semana de tratamento, de acordo com os critérios descritos na **tabela 6**.

Ao término do estudo, em outubro de 1995, 143 pacientes com diagnóstico confirmado de HCL multissistêmica foram incluídos e randomizados em um dos dois braços de tratamento: 74 pacientes para o braço A (VMB) e 69 pacientes para o braço B (VP-16). As drogas, doses e esquema de tratamento encontram-se na **figura 3**.

**Figura 3 – Esquema de tratamento do LCH I (GADNER et al., 2001)**



A monoterapia com VMB ou VP-16 foi equivalente ( $p \geq 0,2$ ) em todos os aspectos: resposta à sexta semana (57% e 49%), resposta à última avaliação (58% e 69%), toxicidade (47% e 58%) e probabilidade de sobrevivência (76% e 80%), de reativação da doença (61% e 55%) e de desenvolvimento de sequelas permanentes (39% e 51%). Todas as crianças com idade igual ou superior a dois anos e sem envolvimento de órgãos de risco (fígado, baço, pulmões ou sistema hematopoiético) sobreviveram. Em pacientes com envolvimento de um ou mais desses órgãos, a falta de resposta à sexta semana de tratamento foi preditora de alta taxa de mortalidade (66%) (GADNER et al., 2001).

Os resultados do DAL-HX 83 e 90 foram melhores que os do LCH I com relação à resposta inicial (79% *versus* 53%) e taxa de reativação (30% *versus* 58%). A taxa de mortalidade em torno de 20% foi semelhante entre os estudos. Tal comparação mostrou a clara superioridade da terapia combinada por um ano (DAL-HX 83/90) em relação à monoterapia por seis meses (LCH I), o que inspirou a elaboração do segundo estudo da *Histiocyte Society*, o LCH II (GADNER et al., 2008).

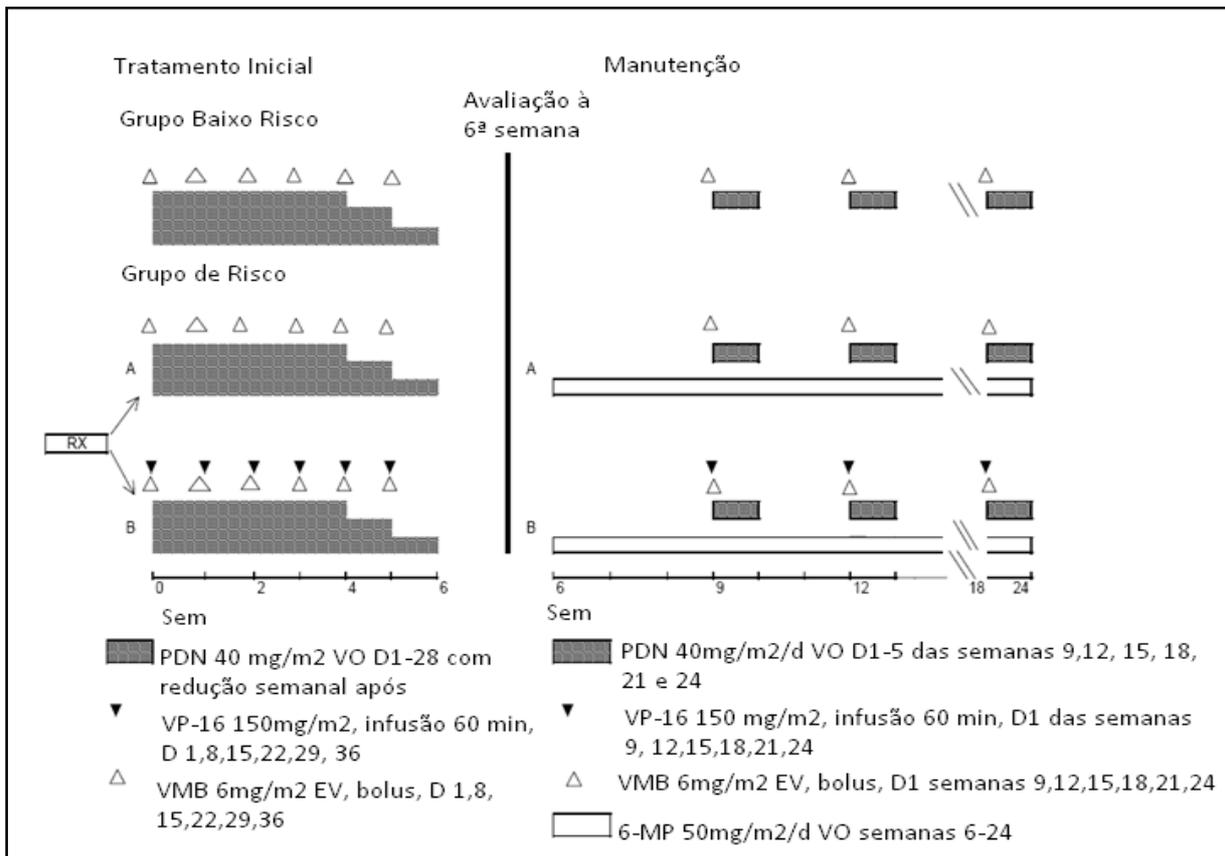
### ***LCH II***

Este foi o segundo estudo prospectivo e randomizado da *Histiocyte Society* (GADNER et al., 2008), realizado no período de maio de 1996 a março de 2001. Teve como objetivos tentar equiparar os resultados terapêuticos aos dos estudos DAL-HX, e esclarecer a importância da adição de VP-16 a PDN e VMB por meio da comparação entre dois braços: com VP-16 (braço B) e sem VP-16 (braço A). O tratamento de manutenção incluiu 6-MP, mas a duração permaneceu limitada a seis meses, como no LCH I. As drogas, doses e esquemas de tratamento encontram-se na **figura 4**.

Os pacientes com HCL multissistêmica foram divididos em dois grupos: o de baixo risco, que incluiu pacientes sem disfunção orgânica e com idade maior ou igual a dois anos; e o de risco, cujos pacientes apresentavam disfunção orgânica ou idade menor que dois anos. Os pacientes de risco foram randomizados em um dos dois braços do tratamento. Os pacientes de baixo risco receberam o tratamento de acordo com o braço A.

Do total de 279 pacientes no grupo de risco, 193 foram randomizados (86 foram excluídos), 93 para o braço A e 100 para o braço B. Quando considerados todos os 193 pacientes, os resultados foram semelhantes nos dois braços. A resposta à sexta semana foi de 63% no braço A e 71% no braço B ( $p=0,24$ ). A probabilidade de sobrevida em 5 anos foi de 74% *versus* 79% ( $p=0,26$ ), a frequência de reativação foi de 46% em ambos os braços ( $p=0,62$ ) e a taxa de sequelas permanentes foi de 43% *versus* 37% ( $p=0,25$ ). Após estratificação por fatores de risco, no entanto, verificou-se que os pacientes com envolvimento de órgãos de risco que participaram do braço B (mais intensivo) tiveram redução de mortalidade quando comparados aos do braço A (RR 0,54 com IC95% de 0,29-1 e  $p=0,049$ ). Os pacientes com envolvimento de órgãos de risco que não responderam à sexta semana de tratamento tiveram a maior taxa de mortalidade. Dos 38 pacientes que não responderam, 11 (52%) do braço A e 7 (41%) do braço B morreram. Os pacientes com idade menor que dois anos **sem** envolvimento de órgãos de risco apresentaram probabilidade de sobrevida de 100% e alta taxa de resposta à sexta semana (80%).

**Figura 4- Esquema de tratamento do LCH II (GADNER et al., 2008)**



Quando comparado ao LCH I, o LCH II apresentou maior taxa de resposta inicial (67% versus 43%,  $p < .001$ ), o que foi atribuído ao aumento da intensidade de tratamento ao longo dos quatro braços dos dois estudos. Quando considerados todos os pacientes de risco, houve aumento da taxa de resposta de 47% no braço A do LCH I para 72% no braço B do LCH II ( $p < .002$ ) e, quando considerados somente os pacientes com disfunção orgânica, aumento de 43% no braço A do LCH I para 68% no braço B do LCH II ( $p < .027$ ). No entanto, o tratamento mais intensivo não teve impacto na redução da frequência de reativações, com valores ainda acima dos encontrados nos estudos DAL-HX.

As principais conclusões do LCH II foram as seguintes:

- Com relação à sobrevida, disfunção orgânica e ausência de resposta precoce ao tratamento foram os principais fatores de mau prognóstico na HCL multissistêmica. Idade menor que dois anos, por si só, não deveria mais ser considerada como fator de mau prognóstico;
- O aumento da intensidade do tratamento melhorou a taxa de resposta inicial e diminuiu a de mortalidade nos pacientes com acometimento de órgãos de risco (GADNER et al., 2008).

### ***LCH III***

O LCH III é o estudo mais recente da *Histiocyte Society*. Foi iniciado em abril de 2001 e, após um período de estudo de cinco anos e cinco meses, 1045 pacientes foram admitidos para tratamento até agosto de 2007. Dos 1045 pacientes, 489 apresentavam doença multissistêmica, sendo 255 (52%) considerados de risco e 234 (48%) de baixo risco. Atualmente, o estudo está fechado para a admissão de novos pacientes. (HISTIOCYTE SOCIETY, 2008).

Os principais objetivos foram: 1) avaliar o impacto da introdução do methotrexate (MTX) na diminuição da mortalidade na doença multissistêmica em geral (em torno de 20% nos estudos anteriores) e na presença de envolvimento de órgãos de risco; 2) avaliar o efeito do prolongamento da terapia de manutenção na diminuição da frequência de reativações da doença; 3) estudar a resposta, morbidade e frequência

de sequelas permanentes nos diferentes grupos de risco, através do tratamento adaptado à extensão e gravidade da doença (HISTIOCYTE SOCIETY, 2002).

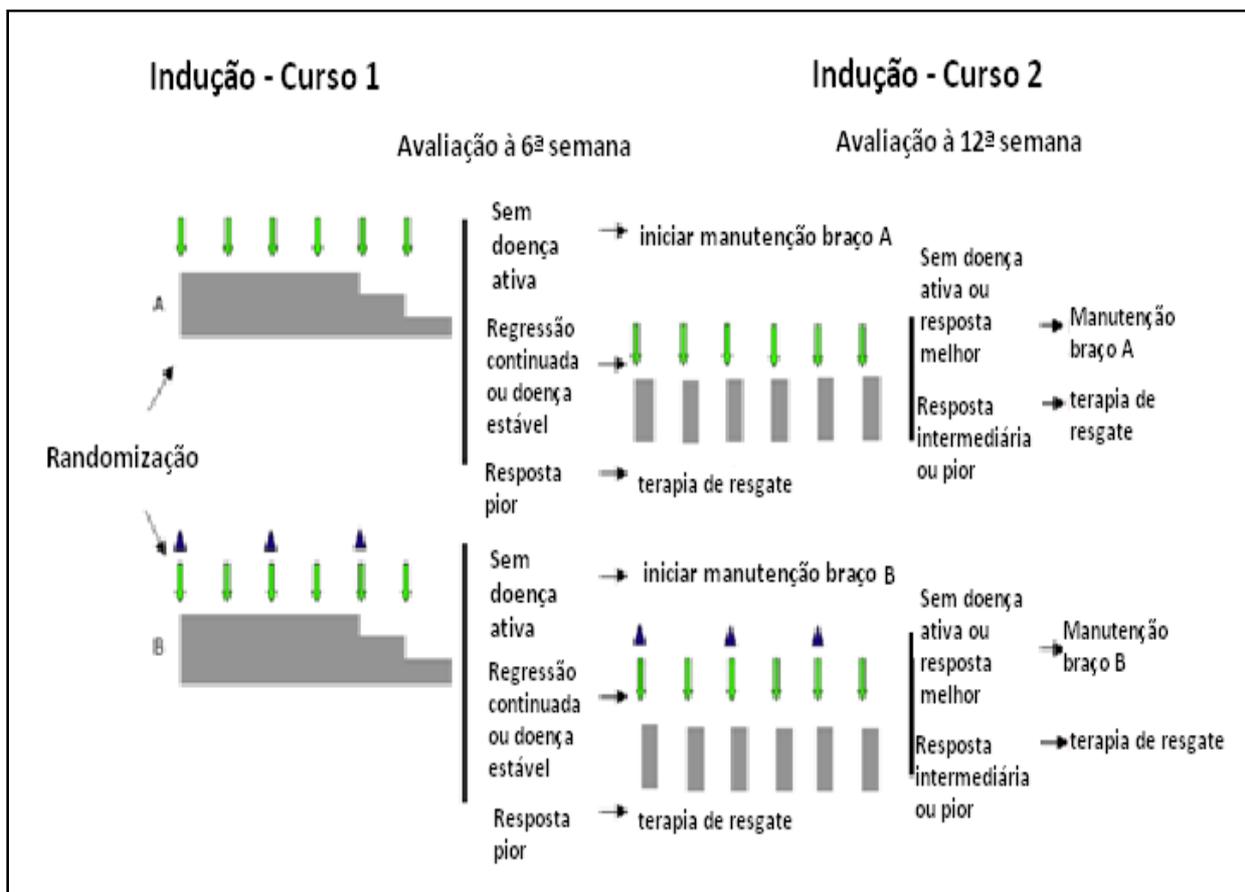
A definição dos grupos de risco e o esquema terapêutico proposto para cada um deles foram os seguintes:

**1. Doença multissistêmica de “risco”**

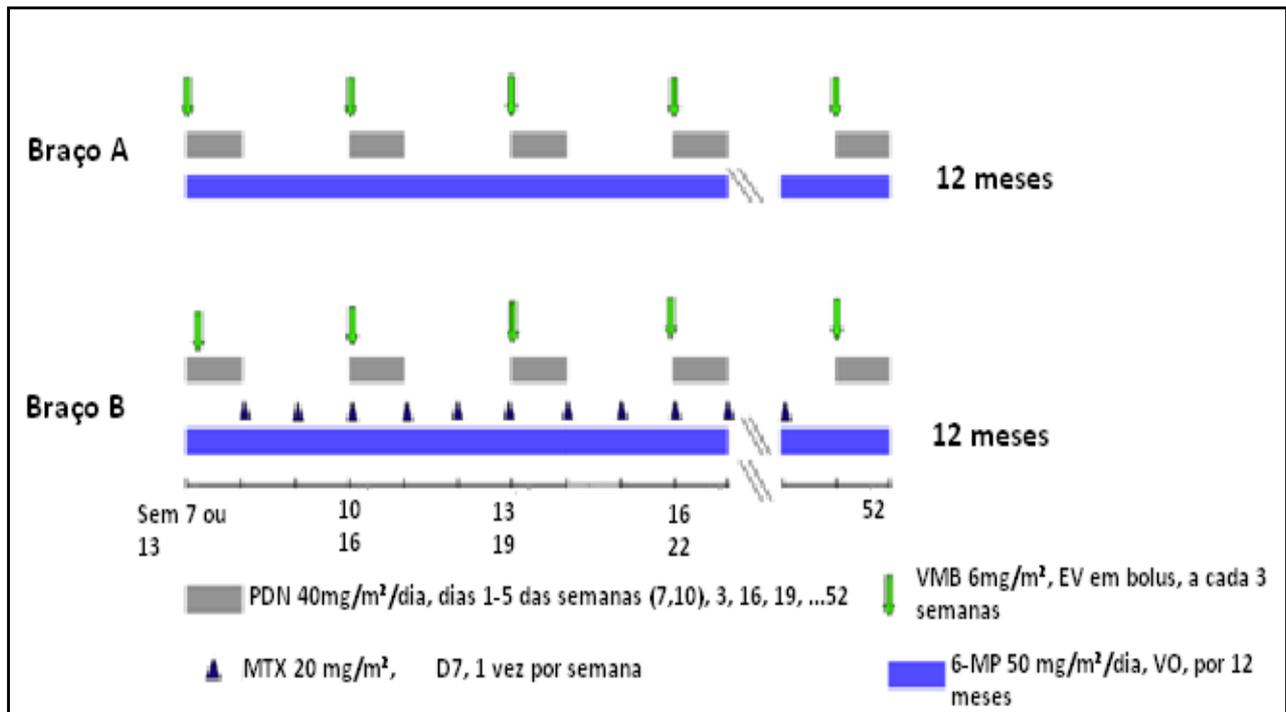
**Definição:** pacientes com doença multissistêmica e envolvimento de um ou mais órgãos de risco (fígado, baço, pulmões, sistema hematopoiético). Os pacientes com doença pulmonar isolada não foram incluídos no estudo.

**Tratamento:** Com duração total de 12 meses, consistia de um ou dois cursos iniciais de seis semanas (de acordo com a resposta) com PDN e VMB (braço A), além de MTX (braço B). A manutenção foi realizada com 6-MP, PDN e VMB (braço A), além de MTX (braço B). O esquema encontra-se representado nas *figuras 5 e 6*.

**Figura 5- Esquema de indução do LCH III (cursos 1 e 2) para o grupo de alto risco (HISTIOCYTE SOCIETY, 2002)**



**Figura 6 – Esquema de manutenção do LCHIII para o grupo de alto risco (HISTIOCYTE SOCIETY, 2002)**

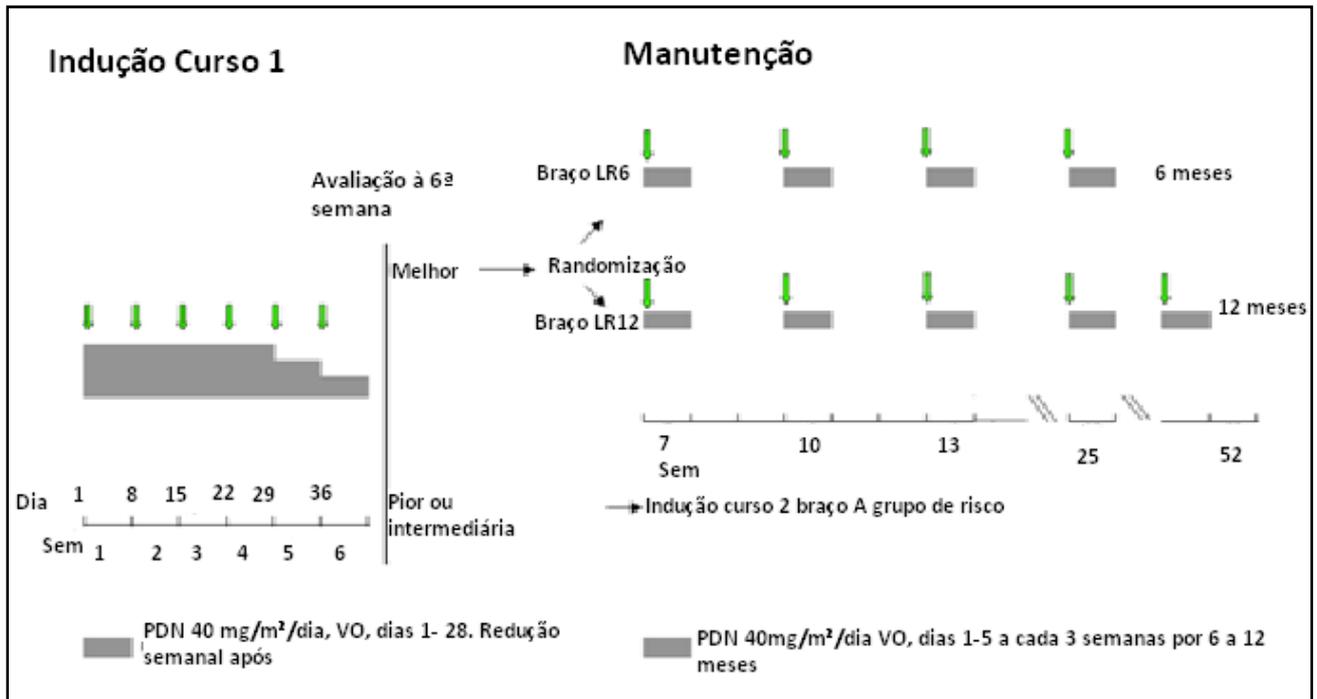


## 2. Doença multissistêmica de “baixo risco”

**Definição:** pacientes com doença multissistêmica, mas sem envolvimento de órgãos de risco.

**Tratamento:** a duração total do tratamento foi de seis (braço LR6) ou 12 meses (braço LR12), definida através de randomização. Tanto o tratamento inicial (um ou dois cursos de seis semanas, conforme resposta) quanto a manutenção foram realizados com PDN e VMB. O esquema de tratamento encontra-se representado na **figura 7**.

**Figura 7 – Esquema de tratamento do LCHIII (Indução e Manutenção) para o grupo de Baixo Risco (HISTIOCYTE SOCIETY, 2002)**

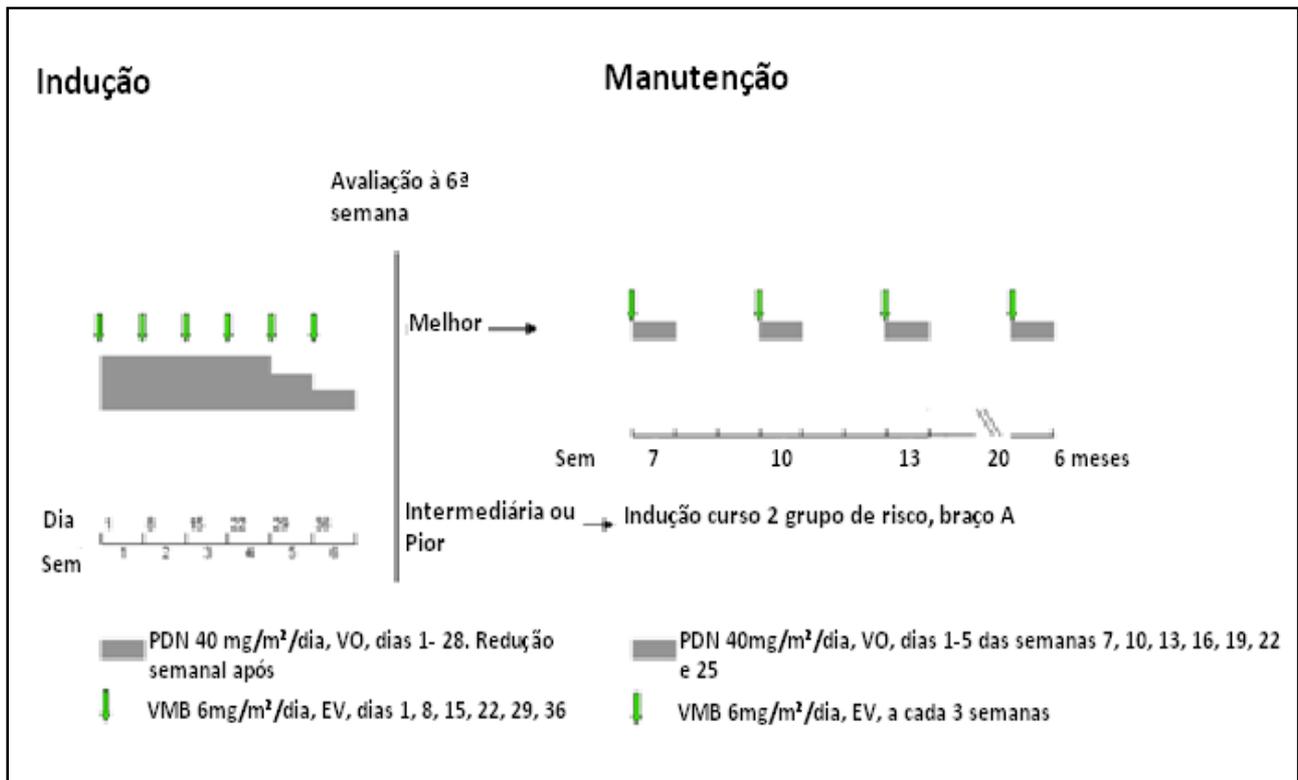


### 3. Doença unissistêmica com “doença óssea multifocal” ou envolvimento localizado de “sítios especiais”

**Definição:** pacientes com lesões ósseas em dois ou mais ossos diferentes ou pacientes com lesões em locais de risco para o desenvolvimento de doença em sistema nervoso central (SNC), com extensão intracraniana de tecido mole ou lesões vertebrais com extensão intra-vertebral de tecido mole. São definidas como lesões de risco para envolvimento de SNC as localizadas em: ossos das regiões temporal, mastoideana, esfenoidal, zigomática, etmoidal, orbitária, maxilar, sinusal ou das fossas cranianas anterior e média, com extensão de tecido mole intracraniano demonstrada por ressonância nuclear magnética (RNM).

**Tratamento:** mesmo tratamento do grupo 2, porém com duração total de seis meses. O esquema de tratamento encontra-se representado na **figura 8**.

**Figura 8 – Esquema de tratamento do LCHIII para doença óssea multifocal (HISTIOCYTE SOCIETY, 2002)**



### 12.3 Diretrizes da *Histiocyte Society* para a avaliação e tratamento dos pacientes com HCL

Em abril de 2009, a *Histiocyte Society* apresentou um guia com o objetivo de fornecer uma visão geral das estratégias recomendadas para a avaliação e tratamento dos pacientes com HCL. As recomendações foram baseadas em práticas já bem estabelecidas e levaram em consideração os resultados preliminares do estudo LCH III. A *Histiocyte Society* sugere que os pacientes que não estejam envolvidos em ensaios clínicos ou protocolos de pesquisa sejam tratados de acordo com essas orientações. (HISTIOCYTE SOCIETY, 2009)

Entre os aspectos importantes, os autores avaliam que o diagnóstico definitivo da HCL pode ser estabelecido pela presença de achados histológicos característicos associados à positividade para o antígeno de superfície CD1a e/ou para Langerina (CD207). Como a expressão da Langerina está relacionada à presença de grânulos de Birbeck (VALLADEAU J et al., 20000), a demonstração desses grânulos nos histiócitos à

microscopia eletrônica, considerada previamente como padrão-ouro para o diagnóstico, não seria mais necessária.

A terapia sistêmica estaria indicada para os pacientes com doença unissistêmica com envolvimento ósseo multifocal, com risco de acometimento do sistema nervoso central e com envolvimento em “sítios especiais”. Também seria indicada para os pacientes com doença multissistêmica com ou sem envolvimento de órgão de risco. As definições desses acometimentos foram estabelecidas de acordo com a classificação adotada no estudo LCHIII, descrita em item anterior.

As seguintes considerações foram feitas pelos responsáveis pela elaboração das diretrizes, no sentido de justificá-las:

1. De acordo com os dados preliminares do estudo LCH III, ainda não publicados, os pacientes que recebem tratamento por um período de 12 meses parecem ter menor risco de reativação do que aqueles com tempo total de tratamento de seis meses. Os pacientes com doença multissistêmica que apresentam boa resposta inicial ao tratamento convencional têm ótima chance de sobrevida prolongada. Os pacientes com envolvimento de órgão de risco sem resposta à sexta semana de tratamento, especialmente aqueles com progressão clínica da doença, apresentam prognóstico desfavorável. A combinação de prednisona (PDN) e vimblastina (VMB) é comprovadamente efetiva, com mínima toxicidade. Portanto, deve ser considerada como padrão para o tratamento inicial de todos os pacientes para os quais a terapia sistêmica está indicada.
2. Os pacientes com doença óssea multifocal têm excelente prognóstico, mas alta tendência para reativação e aparecimento de sequelas permanentes, assim como aqueles com acometimento de sítios especiais e com risco de acometimento do sistema nervoso central. O tratamento nesses casos está indicado com a intenção de prevenir reativações e sequelas. No entanto, não existem evidências que permitam indicar qual seria o melhor regime terapêutico para esses subgrupos.

De forma resumida, o esquema terapêutico indicado prevê um ciclo inicial de seis semanas com o uso de VMB e PDN. A terapia subsequente dependerá da resposta

ao tratamento avaliada à sexta semana. Os ciclos de quimioterapia desde a fase inicial são semelhantes ao braço A do grupo de alto risco do protocolo LCH III (figuras 5 e 6). A duração total do tratamento é de 12 semanas para todos os grupos, inclusive para os pacientes com doença óssea multifocal, com envolvimento de “sítios especiais” e com risco de acometimento do SNC. Os pacientes com envolvimento de órgãos de risco ao diagnóstico, que não demonstrarem melhora desse envolvimento, são candidatos a tratamentos de resgate. O mesmo é recomendado para aqueles que não tinham envolvimento de órgãos de risco ao diagnóstico, mas que desenvolveram acometimento desses órgãos durante o tratamento (HISTIOCYTE SOCIETY, 2009).

### **13. Tratamentos de resgate para doença resistente**

Os pacientes de risco que não respondem ao tratamento apresentam altas taxas de mortalidade (em torno de 75%), não apresentando cura com nenhum dos tratamentos convencionais (GADNER et al., 2001). Na tentativa de melhorar a sobrevida desses pacientes, várias drogas e/ou procedimentos têm sido investigados ao longo dos anos. Entre as drogas pesquisadas encontram-se ciclosporina A de forma isolada (MAHMOUD et al., 1991; ARICÒ et al., 1995) ou em combinação com globulina anti-timócito e prednisona (MINKOV et al., 2003), além de esquemas com associação de ara-C, vincristina e prednisolona (EGELER et al., 1993), entre outros. Apesar de resultados promissores iniciais, esses esquemas não se mostraram claramente benéficos em estudos posteriores (MINKOV et al., 1999; MINKOV et al., 2003).

De todos os agentes pesquisados, o análogo de nucleosídeo 2-clorodeoxiadenosina (2-CDA) foi o único que demonstrou algum possível benefício como monoterapia, mas são necessários estudos adicionais para sua incorporação como agente de primeira linha (STINE et al., 2004; WEITZMAN et al., 1999, RODRIGUEZ-GALINDO et al., 2002; BISWAS et al., 2007; PARDANANI et al., 2003). Em 2005, estudo piloto do grupo francês, utilizando terapia de salvamento com associação de 2-CDA e Ara-C, encontrou resultados promissores. Sete dos 10 pacientes tratados apresentaram sobrevida a longo prazo, dois pacientes morreram por toxicidade precoce e um morreu após transplante de medula óssea (BERNARD et al., 2005).

Estudo recente (APOLLONSKY & LIPTON, 2009) com cinco pacientes também avaliou a eficácia da terapia de resgate com 2-CDA e Ara-C. Todos apresentaram imunossupressão grave e prolongada durante o tratamento, mas encontravam-se em remissão da doença durante o tempo observado (de 2,5 a 6 anos).

Em abril de 2004, a *Histiocyte Society* iniciou o estudo LCH-S 2005 (THE LANGERHANS CELL HISTIOCYTOSIS SALVAGE THERAPY WORKING GROUP HISTIOCYTE SOCIETY, 2005) com o objetivo de avaliar a possível eficácia da combinação de Ara-C e 2-CDA como tratamento de resgate para a HCL. O último relatório do estudo (HISTIOCYTE SOCIETY, 2008) informou que, até setembro de 2008, apenas oito pacientes haviam sido registrados. A avaliação da resposta após dois cursos de tratamento foi possível em sete dos oito pacientes, sendo a resposta de quatro deles considerada como “doença ativa estável” e três como “doença ativa melhor”. Todos os pacientes apresentaram resposta completa entre 5 e 9 meses após o tratamento e estavam vivos quando a análise foi realizada. Com relação à toxicidade, todos os pacientes apresentaram pancitopenia grave. O estudo permanece em aberto, aguardando registro de um maior número de pacientes (HISTIOCYTE SOCIETY, 2008)

O transplante de medula óssea (TMO) foi introduzido como terapia para HCL refratária a partir de 1987 (RINGDÉN et al., 1987). Estudo publicado em 2008 relata que o TMO havia sido realizado em menos de 50 casos de HCL até aquele momento, com bom controle da doença, mas com elevada toxicidade precoce, possivelmente associada ao regime mieloablativo de condicionamento (CASELLI & ARICÒ, 2008). Em estudo com nove pacientes transplantados sob regime de condicionamento de intensidade reduzida, sete sobreviveram e não demonstravam sinais de atividade da doença após uma mediana de acompanhamento de 390 dias pós- transplante de medula óssea (STEINER et al., 2005). Tais resultados sugerem que esse manejo poderia melhorar a sobrevida desses pacientes, mas estudos prospectivos são necessários para confirmar essa hipótese. Por esse motivo a *Histiocyte Society* iniciou um estudo em 2006 com o objetivo de determinar a sobrevida global e livre de eventos com um e três anos após TMO realizado sob regime de condicionamento de intensidade reduzida, nos pacientes com HCL de alto risco, ou seja, com envolvimento de um ou mais órgãos de risco e progressão da doença após tratamento com LCH III (ou outro protocolo

convencional) e que apresentaram falência após pelo menos um ciclo do LCH-S 2005 (LCH-HCT STUDY GROUP OF THE HISTIOCYTE SOCIETY, 2006). Segundo último relatório, apenas um paciente foi registrado até o momento e o estudo permanece em aberto (HISTIOCYTE SOCIETY, 2008).

#### 14. Reativações e sequelas

A **reativação** é definida como o reaparecimento de sinais e/ou sintomas da doença após regressão resultante de um curso de tratamento de seis semanas (POLLONO et al., 2007). Estudo retrospectivo realizado no período de outubro de 1987 a abril de 2002 em três hospitais pediátricos na Argentina (POLLONO et al., 2007) avaliou 300 pacientes diagnosticados no período. Reativações da doença foram verificadas em 29,7% dos casos, após uma mediana de tempo de observação de 4,8 anos. Destes, 34,8% dos casos tiveram mais de um episódio de reativação. Quanto pior o estadio do paciente, maior a incidência de reativação observada - de 17,4% no grupo de doença unissistêmica unifocal para 53,5% na doença multissistêmica com disfunção orgânica ( $p < 0,001$ ). A maioria dos episódios de reativação ocorreu nos 2 primeiros anos de acompanhamento (88%) e os sítios mais comumente envolvidos foram ossos, ouvido médio e pele. Reativação em órgãos de risco foi rara (9,5%). Indivíduos que apresentaram um ou mais episódios de reativação da doença tiveram, aparentemente, maior chance de desenvolverem sequelas.

Recente estudo retrospectivo (MINKOV et al., 2008) encontrou resultados semelhantes aos descritos pelo estudo de Pollono e colaboradores. Foram avaliados os dados de 563 pacientes com doença multissistêmica incluídos nos estudos DAL-HX, LCH I e LCH II. A probabilidade de uma primeira reativação foi de 46%, ocorrendo, na maioria dos casos, nos primeiros dois anos de doença. A presença de reativações foi associada a um risco duas vezes maior de desenvolvimento de sequelas permanentes.

A **sequela permanente** é definida como qualquer condição clínica irreversível, desenvolvida a qualquer momento durante o curso da doença e que apresente correlação direta com a história natural da HCL ou com seu tratamento. Pode estar

presente tanto ao diagnóstico, quanto ocorrer após 10 anos ou mais do tratamento da doença (HAUPT et al., 2004).

A incidência geral de sequelas relatada nos diferentes estudos varia de 20% a 70% (CECI et al., 1993; HAUPT et al., 2004, WILLIS et al., 1996; LAU et al., 2008; GADNER et al., 2001; MINKOV et al., 2000; GADNER et al., 2008; MORIMOTO et al., 2006; THE FRENCH LANGERHANS' CELL HISTIOCYTOSIS STUDY GROUP, 1996; NANDURI et al., 2006). Tal discrepância pode ser devida à diferença entre os estudos com relação ao tamanho de amostra, viés de seleção, tratamento utilizado, duração do acompanhamento, definição de sequelas permanentes e métodos para coleta de informações (LAU et al., 2008). Pacientes com doença multissistêmica apresentam maior frequência de sequelas que os com HCL unissistêmica (73% *versus* 17%,  $p < 0,0001$ ) (HAUPT et al., 2004; LAU et al., 2008).

O *Diabetes insipidus* (DI) é a sequela mais frequentemente relatada pela maioria dos estudos (HAUPT et al., 2004; THE FRENCH LANGERHANS' CELL HISTIOCYTOSIS STUDY GROUP 1996; MINKOV et al., 2000; GADNER et al., 2001; GADNER et al., 2008). Parece haver um maior risco de desenvolvimento de DI em pacientes com envolvimento craniano, do ouvido e do sistema nervoso central. Baixa estatura, deficiência de hormônio tireoidiano e outras anormalidades endócrinas também são relatadas, embora com menor frequência. Uma vez estabelecido, o DI geralmente não é reversível, embora sejam relatados alguns casos em que houve remissão espontânea, com uso de 2-CDA ou etoposídeo, e ainda após irradiação da região hipotálamo-hipofisária (OTTAVIANO & FINLAY, 2003; ABLA, et al., 2009). A recomendação mais aceita é a de que o DI seja tratado com o uso de DDAVP. Tais pacientes podem beneficiar-se de quimioterapia sistêmica em baixas doses, por tempo prolongado, na tentativa de se evitarem consequências secundárias, como disfunção da hipófise anterior e doença neurodegenerativa. O uso da irradiação da região hipotálamo-hipofisária não é indicado, devido aos efeitos tardios a ela relacionados (ABLA, et al., 2009).

Anormalidades esqueléticas também podem estar presentes. Estudo recente (LAU et al., 2008) demonstrou que, enquanto DI foi a sequela mais encontrada nos

pacientes com doença multissistêmica (65%), anormalidades ortopédicas e cosméticas foram responsáveis pela maioria das sequelas relatadas nos pacientes com doença unissistêmica. Outras sequelas relatadas são perda auditiva, anormalidades neurológicas (mais frequentes em pacientes com envolvimento de ouvido, ossos faciais ou orbitários e entre os portadores de DI), perda dentária, fibrose pulmonar e hepática, entre outros.

O desenvolvimento de neoplasias secundárias também é relatado e a causa para seu desenvolvimento ainda não é totalmente esclarecida. Postula-se que poderia estar relacionada ao tratamento da doença, principalmente com uso de VP-16 e irradiação, ou que a própria HCL seria associada a uma maior suscetibilidade para o desenvolvimento de neoplasias (HOWART et al., 1999; EGELER et al., 1998; DE CAMARGO et al., 1993; LOPES & DE CAMARGO, 1999). A *Histiocyte Society*, através de seu grupo de estudos de doenças malignas associada à HCL (THE LCH-MALIGNANCY STUDY GROUP) relatou em 2008 o registro de 190 casos de doenças malignas em pacientes com HCL. Destes, 92 tiveram diagnóstico de HCL na infância e 98 após os 18 anos (HISTIOCYTE SOCIETY, 2008).

## Estudo

### 1. Objetivos

- Rever os achados anátomo-patológicos e imuno-histoquímicos das crianças e adolescentes com diagnóstico prévio de HCL, visando a estabelecer o diagnóstico definitivo por meio da pesquisa do antígeno CD1a.
- Comparar a evolução da doença de acordo com a idade, gênero, estadiamento ao diagnóstico, resposta à sexta semana de tratamento e certeza diagnóstica.

### 2. Material e métodos

O estudo foi realizado com pacientes do Serviço de Hematologia Pediátrica do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (HC-UFMG). Foram incluídos todos os pacientes portadores de HCL diagnosticados no período de julho de 1988 a outubro de 2008, cuja idade ao diagnóstico era menor ou igual a 18 anos. Neste período, 37 crianças foram diagnosticadas e/ ou tratadas na instituição.

O estudo foi essencialmente retrospectivo e descritivo. Por meio da revisão dos prontuários arquivados no Serviço de Arquivo Médico (SAME) e no Serviço de Hematologia do HC-UFMG, os seguintes dados foram coletados: idade, sexo, tempo de seguimento, localização da doença, manifestações clínicas ao diagnóstico, estadiamento, esquema terapêutico, resposta ao tratamento – reativação, óbito ou remissão – além de possíveis sequelas e complicações. Os resultados anátomo-patológicos e imuno-histoquímicos prévios também foram anotados.

Após a coleta dos dados, os pacientes foram classificados retrospectivamente segundo os critérios propostos pela *Histiocyte Society* (THE CLINICAL WRITING GROUP OF HISTIOCYTE SOCIETY, 1987; FAVARA et al., 1997) para diagnóstico, estadiamento e resposta à sexta semana de tratamento, conforme descrito a seguir:

## 2.1 Critérios de classificação adotados

### a) Diagnóstico

- Diagnóstico presuntivo – achados clínicos característicos associados à histologia sugestiva à microscopia óptica, ou seja, acúmulo e proliferação de células de Langerhans além de eosinófilos, macrófagos, linfócitos, células gigantes multinucleadas e, menos comumente, neutrófilos e plasmócitos.
- Diagnóstico provável – microscopia óptica sugestiva associada à positividade da proteína S100. A pesquisa de CD68 também foi realizada.
- Diagnóstico definitivo - histologia característica associada à positividade para o antígeno de superfície CD1a à imuno-histoquímica ou presença de grânulos de Birbeck nos histiócitos à microscopia eletrônica.

### b) Estadiamento

Para o estadiamento, todos os pacientes foram submetidos, de acordo com o protocolo da instituição, à avaliação clínica e laboratorial. Os exames foram realizados pelo Laboratório Central, Serviço de Radiologia e Serviço de Anatomia Patológica do HC-UFMG e incluíram: hemograma, coagulograma, ureia, creatinina, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), bilirrubinas totais e frações, fosfatase alcalina, proteínas totais e frações, exame de urina rotina e estudo radiológico – radiografia de crânio, bacia, tórax e ossos longos. A ressonância magnética foi indicada na presença de anormalidades visuais, neurológicas e suspeita de *diabetes insipidus*. A tomografia de tórax foi indicada na presença de radiografia de tórax alterada, taquipneia, retrações intercostais. O exame de ultrassonografia abdominal foi indicado na presença de hepato e/ou esplenomegalia. Biópsia hepática foi realizada na presença de disfunção do fígado. Demais lesões suspeitas de envolvimento foram biopsiadas, quando indicado. O teste de privação de líquidos, a dosagem de imunoglobulinas e os testes cutâneos foram realizados quando houve suspeita clínica de *diabetes insipidus* ou imunodeficiência. O mielograma foi realizado quando a criança apresentava plaquetopenia, leucopenia ou anemia de causa desconhecida.

Os pacientes foram classificados retrospectivamente, de acordo com o seguinte esquema de estadiamento (GADNER et al., 2001; GADNER et al., 2008; HISTIOCYTE SOCIETY, 2002):

- Estadio I – Doença unissistêmica: envolvimento de um único órgão ou sistema.

O estadio I foi subdividido em 2 grupos:

IA - Unifocal: acometimento de um único sítio. Exemplos: lesão óssea solitária, acometimento cutâneo isolado ou acometimento de um linfonodo único, ou

IB – Multifocal: acometimento de múltiplos sítios de um mesmo órgão. Exemplos: várias lesões ósseas, envolvimento de mais de um linfonodo.

- Estadio II – Doença multissistêmica: envolvimento de mais de um órgão ou sistema.

Foram considerados órgãos de risco o fígado, baço, pulmões e sistema hematopoiético. A disfunção de tais órgãos foi definida de acordo com os seguintes critérios (LAHEY, 1975):

- Disfunção hepática – hipoalbuminemia e/ou atividade de protrombina menor que 50% e/ou sinais de colestase ou enzimas hepáticas aumentadas cinco vezes o valor normal.
- Disfunção do sistema hematopoiético – hemoglobina menor que 10g/dL e/ou contagem de plaquetas menor que  $100 \times 10^9/L$  e/ou global de leucócitos menor que  $4 \times 10^9/L$  e/ou neutrófilos menor que  $1,5 \times 10^9/L$ , tendo sido excluídas outras causas.
- Disfunção pulmonar – sinais de dispneia ou cianose, infiltrado pulmonar alveolar ou intersticial à radiografia de tórax, na ausência de infecção.

### **c) Resposta ao tratamento**

Foram considerados sinais de resposta ao tratamento: desaparecimento das lesões líticas, redução no tamanho dos linfonodos, desaparecimento de visceromegalias, ausência de febre, regressão das lesões de pele e normalização dos

parâmetros laboratoriais – funções renal e hepática e hemograma. Os pacientes foram classificados retrospectivamente em três categorias, de acordo com a resposta obtida à sexta semana de tratamento ( HISTIOCYTE SOCIETY, 2002):

- Resposta “melhor” – resolução completa ou regressão continuada da doença,
- Resposta intermediária - persistência dos sinais ou sintomas, sem novas lesões (estável) ou regressão da doença em determinados sítios, com aparecimento de novas lesões em outros (mista),
- Resposta “pior”- progressão da doença

A reativação foi definida como o aparecimento de novas lesões ou disfunção orgânica após um quadro estável por três meses. Foi considerada seqüela qualquer condição clínica irreversível desenvolvida em qualquer momento do curso da doença (POLLONO et al., 2007)

## 2.2 Esquema terapêutico inicial

Um dos seguintes esquemas foi utilizado como regime inicial de tratamento:

- Prednisona, 40mg/m<sup>2</sup>/dia durante seis semanas,
- Etoposídeo (VP-16) 150mg/m<sup>2</sup>/dia por três dias, três a seis ciclos, com intervalo de três a quatro semanas entre os ciclos,
- Vimblastina 6,0 a 6,5 mg/m<sup>2</sup>/semana durante 12 semanas + prednisona 40mg/m<sup>2</sup>/dia durante seis semanas,
- Protocolo LCH III – braço A,
- Exérese cirúrgica,
- Aplicação intralesional de corticóide.
- Radioterapia dirigida à região hipotálamo-hipofisária (um caso)

A partir de 1996 foi introduzido o uso de sulfametoxazol-trimetoprim para profilaxia das infecções por *Pneumocystis jiroveci*.

Antes de cada ciclo de quimioterapia, as crianças deveriam apresentar contagem global de leucócitos acima de  $2 \times 10^9/L$ , contagem de neutrófilos acima de  $1,0 \times 10^9/L$  e de plaquetas acima de  $100 \times 10^9/L$ . Os pacientes que apresentaram reações graves aos quimioterápicos tiveram seu esquema de tratamento modificado.

### **2.3 Exames anátomo-patológicos, imuno-histoquímicos e microscopia eletrônica**

O Serviço de Anatomia Patológica do HC-UFMG foi responsável pela análise de todas as biópsias realizadas na instituição, além da revisão dos casos diagnosticados em outras instituições.

Em três casos foi realizada a pesquisa de grânulos de Birbeck por meio de microscopia eletrônica. Em um deles, tal exame foi realizado em outra instituição. Nos dois casos restantes, o exame foi realizado pela Professora do Departamento de Anatomia Patológica e Medicina Legal da Faculdade de Medicina da UFMG – Virgínia Hora Rios Leite.

Antes de 2004, a pesquisa do antígeno CD1a por meio do anticorpo específico utilizado em cortes congelados não era disponível na instituição. Durante esse período, tais exames foram realizados em outros serviços, o que foi possível em apenas 4 dos 30 casos diagnosticados até então. A partir de 2004, a pesquisa de CD1a tornou-se disponível na instituição com a aquisição do anticorpo monoclonal CD1a (clone 010), adequado para a pesquisa em cortes processados em parafina.

Os blocos de parafina das biópsias realizadas na instituição ao diagnóstico ou reativação foram armazenados no Serviço de Anatomia Patológica do HC-UFMG com a finalidade de garantir amostra para uma eventual necessidade de reavaliação do diagnóstico. Após autorização dos pacientes (quando devida) e do Serviço de Anatomia Patológica, os blocos de parafina e as lâminas coradas por hematoxilina e eosina (HE) dos pacientes sem diagnóstico definitivo prévio e de 3 pacientes cujo diagnóstico definitivo já havia sido realizado (2 por CD1a e 1 por ME) foram pesquisados nesse

arquivo. Os blocos de parafina das biópsias realizadas em outros serviços (ainda que revisadas no HC) foram solicitados aos laboratórios responsáveis por sua realização.

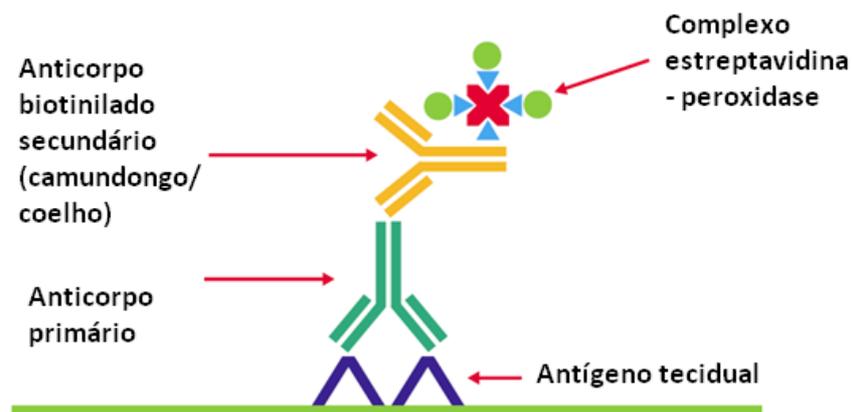
### **Métodos imuno-histoquímicos**

#### **a) Princípios básicos**

O método imuno-histoquímico para a detecção de CD1a utiliza a técnica do complexo avidina-biotina, baseada no princípio da ligação entre enzima e substrato. A estreptavidina (produzida pelo *Streptomyces avidinii*) e a avidina (extraída do ovo de galinha) são proteínas que possuem quatro sítios de ligação à vitamina biotina. A molécula de biotina pode ser conjugada a anticorpos e enzimas com facilidade (KEY, 2006). A peroxidase de rábano silvestre é uma enzima isolada da raiz da planta *Cochlearia armoracia*. Tal enzima possui um grupo heme e, quando em solução, é da cor marrom (BOENISCH, 2006).

Pelo método do complexo estreptavidina-biotina marcada (*labeled streptavidin-biotin-LSAB*), anticorpos secundários são conjugados à biotina e funcionam como ligação entre anticorpos primários ligados ao tecido e um complexo estreptavidina-peroxidase (KEY, 2006). O cromógeno 3,3'-diaminobenzidinetetrahydroclorido (DAB) é adicionado, ligando-se à peroxidase. A positividade da reação é demonstrada através da presença de cor marrom (BOENISCH, 2006). O método descrito encontra-se esquematizado na **figura 9**.

**Figura 9: Método Estreptavidina- Biotina marcada (KEY, 2006)**



➤ **Bloqueio da peroxidase endógena**

A peroxidase também está presente de forma endógena em algumas células / tecidos tais como hemácias, granulócitos, eosinófilos, monócitos, hepatócitos, músculos e rins. As enzimas presentes nessas células podem reagir com o peróxido de hidrogênio ligado ao cromógeno, levando a reações falso-positivas. Assim, faz-se necessário o bloqueio da peroxidase endógena, o que é realizado através da adição de peróxido de hidrogênio antes do complexo estreptavidina peroxidase. A peroxidase endógena é inibida pelo excesso de substrato, tornando-se incapaz de reagir com o cromógeno (PACE, 2006).

➤ **Bloqueio da avidina e biotina endógenas**

A biotina está presente de forma endógena e sua ligação com a avidina administrada pode prejudicar o sucesso do exame, levando a falsos positivos ou artefatos. Para evitar que isso aconteça é realizado o bloqueio da atividade endógena de ligação à avidina (AELA). Tradicionalmente, esse bloqueio é realizado através da incubação do material com solução de avidina seguida pela solução de biotina, imediatamente antes da incubação com o anticorpo primário (MILLER et al., 1999). Após a descoberta de que o leite é rico em biotina, Miller e colaboradores (MILLER et al., 1999) demonstraram que ele pode ser usado de forma eficaz como fonte de biotina para o bloqueio da AELA ao invés da biotina disponível comercialmente, o que diminui os custos da reação. A estreptavidina apresenta menor taxa de ligações teciduais inespecíficas, se comparada à avidina.

➤ **Controles**

Alguns fatores podem contribuir para variações dos resultados à imuno-histoquímica. Diferenças no tipo e tempo de fixação do tecido, variações diárias de temperatura e qualidade dos reagentes podem prejudicar o exame. Para assegurar que a técnica foi realizada corretamente são utilizados controles dos reagentes e controles teciduais durante a reação. Tais controles podem ser negativos ou positivos (RASMUSSEN, 2006).

- Controle dos reagentes: é realizado pelos laboratórios fabricantes, através do teste do reagente em tecidos sabidamente positivos ou negativos. Os usuários dos reagentes também devem testar sua eficácia e diluição mais apropriada antes de sua utilização. O controle negativo dos reagentes pode ser realizado através da utilização de diluente ao invés do anticorpo primário. Nesse caso, a reação deverá ser negativa (RASMUSSEN, 2006).
- Controle dos tecidos: As amostras sabidamente positivas, ou seja, que contêm o antígeno de interesse são denominadas de controles positivos. As que não contêm tal antígeno são denominadas controles negativos. Caso não ocorra a positividade (ou “negatividade”) esperada para a reação, tais testes deverão ser considerados inválidos. Os controles teciduais podem ser externos ou internos. Nos controles externos, amostras de outros tecidos sabidamente positivos são preparadas da mesma forma que os tecidos de interesse, para confirmação de tal positividade. Nos controles internos (ou intra-lâmina), a positividade de células normais encontradas na própria lâmina da lesão é verificada. A proteína S100, por exemplo, é positiva na lesão de HCL, mas também deve ser positiva nos nervos periféricos normais. Assim, se os nervos periféricos encontrados no tecido pesquisado para a lesão de HCL não forem positivos para S100, tal reação deverá ser considerada inválida (RASMUSSEN, 2006).

## **b) Descrição da técnica utilizada**

### **➤ Preparação do material**

**Desparafinização:** Os blocos de parafina foram cortados em seções de 4 µm de espessura, com o auxílio de um micrótomo. Após cortadas, as seções foram colocadas em água e, logo após, em lâminas. Uma vez nas lâminas silanizadas para melhor aderência dos cortes, a parafina foi completamente removida através dos seguintes procedimentos padronizados:

- Aquecimento das lâminas em estufa a 70°C, *overnight*;
- Retirada das lâminas da estufa e imersão das mesmas em xilol, por 20 minutos;

- Hidratação em banhos de álcool etílico em concentrações decrescentes.
- Imersão em tampão phosphate-buffered-saline (PBS), sem deixar secar.

**Bloqueio da peroxidase endógena:** Os seguintes procedimentos foram utilizados para bloqueio da peroxidase endógena:

- Imersão das lâminas em solução de peróxido de hidrogênio a 3%, preparada momentos antes do uso, por 20 minutos;
- Retirada das lâminas da solução de peróxido de hidrogênio e imersão das mesmas em tampão PBS;
- Lavagem das lâminas com PBS, deixando no último banho por 5 minutos.

**Reativação antigênica:** A reativação antigênica é um procedimento para reverter os efeitos causados pela fixação com formalina e embebimento em parafina. Através do calor úmido, o epitopo antigênico de interesse é exposto, possibilitando a ligação com seu anticorpo específico (KEY & BOENISCH, 2006).

Nesse estudo, a reativação antigênica foi realizada após desparafinização e hidratação das lâminas, além de bloqueio da peroxidase endógena, utilizando a seguinte técnica:

- Imersão das lâminas em cuba contendo tampão citrato, pH 6;
- Transferência das cubas para o *steamer* (marca T-Fal) previamente preenchido com água destilada. Fechamento do *steamer* e colocação de termômetro no mesmo;
- Após alcançada a temperatura de 95°C, manutenção das lâminas no local por mais 20 minutos;
- Retirada das lâminas do *steamer* para resfriamento em temperatura ambiente por pelo menos 20 minutos. Troca da solução tampão por PBS.

**Bloqueio da atividade da biotina endógena:** Após bloqueio da peroxidase endógena, as lâminas foram colocadas em solução de leite (15g de leite em pó para 100 mL de PBS) e deixadas por 15 minutos, sendo lavadas com PBS após esse período.

➤ **Imuno-histoquímica**

Após a preparação descrita acima, as lâminas foram retiradas e secas em torno dos cortes, com papel higiênico macio. Logo após, 50 µL do anticorpo primário previamente diluído (solução de diluição de anticorpos - Dako) foi colocado sobre cada corte. Os anticorpos primários utilizados foram:

- CD1a – marca Dako, clone 010, diluição 1 (anticorpo): 7,5 (diluyente)
- S100 – marca Dako, policlonal, diluição 1:900
- CD68 – marca Dako, clone KP1, diluição 1:100.

Após pingar o anticorpo primário, os seguintes procedimentos foram realizados:

- Incubação das lâminas em câmara úmida. Fechamento da cuba por 40 minutos.
- Lavagem cuidadosa das lâminas usando garrafa lavadora contendo PBS. Transferência das lâminas para cuba contendo PBS.
- Secagem cuidadosa ao redor dos cortes. Pingar uma gota do anticorpo secundário biotilado (Dako) em cima de cada corte. Transferência das lâminas para cuba úmida, mantendo-as no local por 10 minutos.
- Lavagem cuidadosa das lâminas usando garrafa contendo PBS e transferência das mesmas para cuba com PBS após.
- Secagem em volta dos cortes. Pingar uma gota do complexo peroxidase-estreptavidina em cima de cada corte. Transferência das lâminas para câmara úmida, mantendo-as no local por 10 minutos.
- Lavagem cuidadosa das lâminas com PBS (conforme descrito acima) e transferência das mesmas para cuba com PBS.

- Secagem das lâminas. Pingar uma gota do cromógeno DAB em cima de cada corte. Marcar o tempo de coloração de lâmina controle, com checagem sob microscópio e utilizar este tempo para as demais lâminas (geralmente 1 a 3 minutos).
- Transferência das lâminas para um suporte dentro de um recipiente contendo água.
- Deixar o recipiente contendo as lâminas sob água corrente por 2 minutos.
- Imersão das lâminas no corante hematoxilina por 40 segundos. Em seguida, lavagem em água corrente por 1 minuto.
- Imersão das lâminas em cubas contendo álcool com concentrações ascendentes (até álcool absoluto), deixando em cada cuba por 1 minuto.
- Transferência das lâminas para cubas contendo xilol.
- Montagem das lâminas utilizando lamínulas com uma gota de Entelan.
- Após secagem, as lâminas foram observadas no microscópio.

Antes de sua utilização, a eficácia dos reagentes foi verificada através de testes em tecidos sabidamente positivos e negativos (controle dos reagentes). Controles teciduais externos e intra-lâmina também foram utilizados para todos os anticorpos pesquisados (S100, CD1a e CD68).

### **c) Leitura dos exames**

Todas as lâminas coradas por HE e as resultantes de imuno-histoquímica foram analisadas através de microscopia óptica pela Professora Lúcia Porto Fonseca de Castro, médica patologista do Serviço de Anatomia Patológica do HC-UFGM, experiente no diagnóstico de HCL e responsável pela maior parte dos diagnósticos anteriores. Toda a revisão foi acompanhada pela mestrandia. A descrição dos achados anátomo-patológicos e imuno-histoquímicos foi devidamente registrada.

## 2.4 Análise estatística

O banco de dados foi elaborado com o auxílio do programa Excel e a análise estatística de sobrevida foi realizada com os programas SPSS (versão 11.5.0 de setembro de 2002) e EGRET (versão 0.19.6). O método de Kaplan-Meier foi utilizado para estimar a probabilidade de sobrevida global (SGLO) e sobrevida livre de eventos (SLE). Para estimativa da última, foram considerados eventos óbito ou reativação da doença, sendo censurados na data da análise dos resultados (15/12/2008) os pacientes que não sofreram qualquer evento. O teste de logrank foi utilizado para comparação entre as curvas de sobrevida. Foi considerado como estatisticamente significativo o valor de  $p \leq 0,05$ .

## 2.5 Aspectos éticos

O projeto foi aprovado pela Câmara do Departamento de Pediatria, pelo Serviço de Hematologia do HC-UFMG, pelo Departamento de Anatomia Patológica e Medicina Legal da Faculdade de Medicina- UFMG, pela Diretoria de Ensino, Pesquisa e Extensão do HC-UFMG e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (**Anexo 1**).

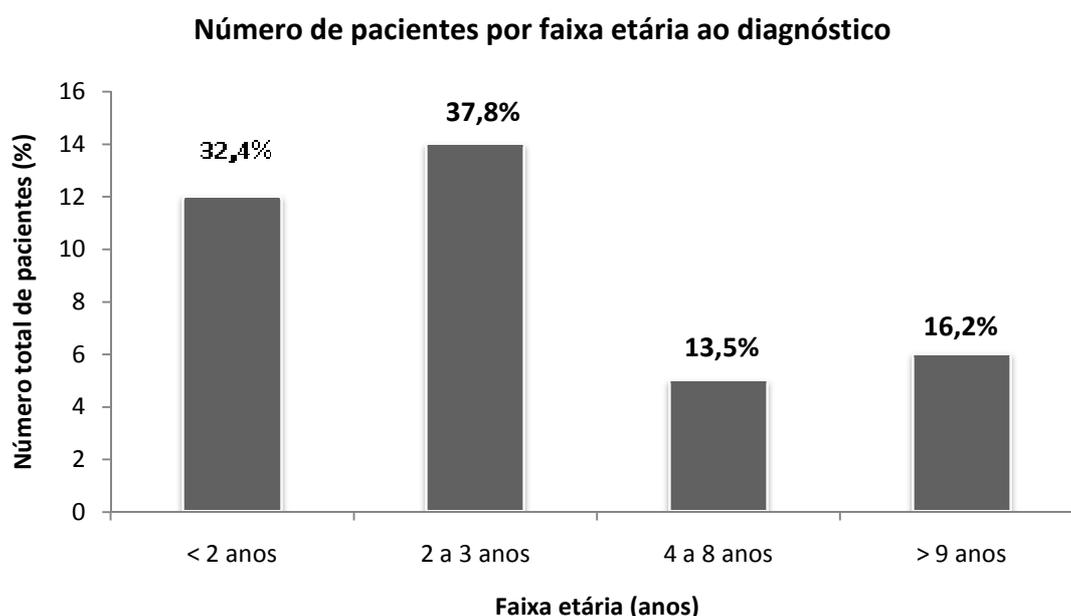
O termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) foi solicitado a todos os pacientes com HCL que permaneciam em acompanhamento no serviço. Dois modelos de TCLE foram utilizados: um destinado aos pais ou responsáveis e às crianças com idade entre 7 e 12 anos e outro para os pacientes com idade igual ou superior a 13 anos (**Anexo 2**).

### 3. Resultados

No período de junho de 1988 a outubro de 2008, 37 crianças portadoras de HCL foram diagnosticadas e/ ou tratadas no Serviço de Hematologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (HC-UFMG). A frequência da doença foi semelhante entre os gêneros, sendo 17 pacientes (45,9%) do sexo masculino e 20 (54,1%) do sexo feminino (relação de 1: 1,2). O tempo de seguimento variou de 1 mês a 20,9 anos, com mediana de 6,2 anos. Ao término do estudo, 18 pacientes ainda se encontravam em acompanhamento no Serviço de Hematologia do HC-UFMG, 3 foram transferidos para outras instituições (Id 7, 18 e 26) , 8 haviam recebido alta em remissão da doença (Id 5, 6, 27, 28, 30, 31, 32 e 35), 4 abandonaram o tratamento, 3 deles em remissão à última consulta (Id 10, 21 e 25) e 1 com lesões ativas (Id 23) e 4 faleceram (Id 8, 9, 17 e 33). Na **tabela 15** estão especificados idade, gênero, estadiio, grau de certeza diagnóstica antes e após o estudo, tratamento inicial, resposta à sexta semana de tratamento, tempo de acompanhamento, número de reativações, situação atual e sequelas dos 37 pacientes do estudo.

A idade ao diagnóstico variou de 1 mês a 16,9 anos, com mediana de 2,4 anos. A distribuição dos pacientes por faixa etária ao diagnóstico encontra-se representada na **figura 10**.

**Figura 10** – Distribuição dos pacientes de acordo com a faixa etária



### Certeza diagnóstica

Ao início do estudo, apenas 13 dos 37 pacientes apresentavam diagnóstico definitivo propiciado pela realização prévia de testes confirmatórios (CD1a ou ME). Dos 24 pacientes restantes, 13 apresentavam diagnóstico presuntivo e 11 provável.

Dos 24 casos sem diagnóstico definitivo prévio, 12 foram revisados (50%). Nos demais, os blocos de parafina resultantes das biópsias não foram encontrados, impossibilitando sua revisão. Dos 12 casos não revisados, quatro apresentavam doença multissistêmica (identificação – Id – 3, 4, 9 e 18), tendo um desses pacientes evoluído para óbito (Id 9). Oito casos apresentavam doença unissistêmica com acometimento dos seguintes sítios: linfonodos (quatro casos, Id 1, 24, 27 e 29), ossos (dois casos, Id 10 e 16) e pele (dois casos, Id 23 e 36).

Aleatoriamente, três dos 13 casos com diagnóstico definitivo prévio (2 por CD1a e 1 por ME) também foram revisados para confirmação do diagnóstico anterior. O número de casos revisados por grupo de certeza diagnóstica encontra-se representado na **tabela 8**.

**Tabela 8 – Número de casos revisados por grupo de certeza diagnóstica**

Diagnóstico	Casos revisados	Casos não revisados*	Total de casos antes do início do presente estudo
Presuntivo	7	6	13
Provável	5	6	11
Definitivo	3	10	13
<b>Total</b>	15	22	37

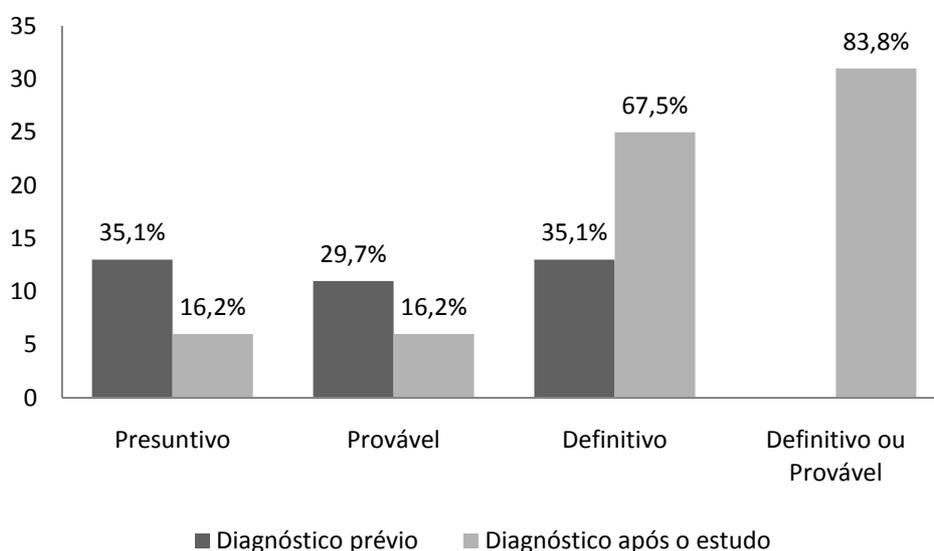
\* Em 12 casos os blocos de parafina não foram encontrados para revisão e em 10 a imuno-histoquímica com CD1a já havia sido realizada previamente ao estudo.

No total, 15 pacientes tiveram suas amostras revisadas (12 sem e 3 com diagnóstico definitivo prévio). Em três casos, mais de uma amostra por paciente foi encontrada, sendo revisados 19 blocos de parafina no total. Destes, 13 correspondiam a biópsias realizadas ao diagnóstico e seis quando da reativação.

Dos 19 blocos examinados, apenas dois foram negativos para CD1a. No primeiro caso (Id 28), uma das amostras do paciente apresentou antigenicidade pouco preservada, mas as outras duas amostras foram positivas para CD1a. No outro caso (Id 32), o exame anátomo-patológico ao diagnóstico de uma das amostras já havia sido considerado como “inconclusivo”. Esse paciente havia sido submetido a duas biópsias ao diagnóstico, e a segunda amostra foi positiva para CD1a, após a revisão.

A pesquisa do antígeno CD1a foi positiva para todos os pacientes em pelo menos uma das amostras, inclusive para os que tinham diagnóstico definitivo prévio por CD1a (Id 14 e 17) ou por ME (Id 28). Assim ao final do estudo, 12 dos 24 pacientes (50%) sem diagnóstico definitivo anterior tiveram seu diagnóstico confirmado. Somando-se aos 13 pacientes com diagnóstico definitivo prévio, 25 dos 37 pacientes (67,5%) tiveram diagnóstico definitivo firmado (*figura 11*). O *anexo 4* contém fotos de alguns exames anátomo-patológicos e imuno-histoquímicos realizados, além de microscopia eletrônica anterior.

**Figura 11 – Número e porcentagem de casos por categoria diagnóstica antes e após o estudo**



Os blocos revisados com os respectivos diagnósticos anteriores ao estudo e o perfil imuno-histoquímico para CD1a, S100 e CD68, após revisão, encontram-se representados na **tabela 9**.

**Tabela 9 – Blocos de parafina revisados em 15 pacientes, diagnóstico prévio e perfil imuno-histoquímico verificado**

Id	Tipo bloco	Material	Diagnóstico Prévio	CD1a	S100	CD68
2	1	osso/ crânio	1	+	+	+
6	1	linfonodo/cervical	1	+	+	-
11	1	osso /costela	2	+	+	+
14	1	massa conduto auditivo	3 (CD1a)	+	+	-
	2	osso / mandíbula	3 (CD1a)	+	+	-
15	1	mastóide / linfonodo	1	+	+	-
17	1	pele / couro cabeludo	3 (CD1a)	+	+	-
19	1	osso/ crânio	2	+	+	+
20	2	lesão perianal	2	+	+	-
25	1	linfonodo	2	+	+	+
28	1	linfonodo / troclear	1	+	+	Avaliação prejudicada
	1	linfonodo / axilar	3 (ME)	Antigenicidade pouco preservada	Avaliação prejudicada	Avaliação prejudicada
30	2	linfonodo / inguinal	1	+	+	+
31	1	linfonodo	1	+	+	+
32	1	linfonodo	1	-	Avaliação prejudicada	Avaliação prejudicada
	1	osso escápula	1	+	+	-
34	2	linfonodo	2	+	+	-
35	2	dente / gengiva	1	+	+	-

**Legenda:** Id – identificação; Tipo bloco: 1- diagnóstico 2- reativação; Diagnóstico prévio: 1- presuntivo 2- provável 3- definitivo ME – microscopia eletrônica

### Manifestações clínicas ao diagnóstico

As manifestações clínicas mais frequentemente encontradas foram lesões ósseas (67,6%), linfadenomegalia (45,9%) e lesões cutâneas (45,9%), conforme apresentado na **tabela 10**.

**Tabela 10 – Manifestações clínicas encontradas ao diagnóstico**

Manifestação clínica	Número de pacientes (n=37)
Lesões ósseas	25 (67,6%)
Linfadenomegalia	17 (45,9%)
Lesões cutâneas ou mucocutâneas	17 (45,9%)
Lesões pápulo-crostosas couro cabeludo/ região inguinal	9
Acometimento gengival ou de palato	3
Lesões ulceradas em vulva	1
Lesão nodular labial	1
Outras	3
Febre	12 (32,4%)
Acometimento de conduto auditivo	9 (24,3%)
Hepatomegalia	9 (24,3%)
Disfunção hepática	4 (10,8%)
Esplenomegalia	7 (18,9%)
<i>Diabetes insipidus</i>	4 (10,8%)
Acometimento pulmonar como parte de doença multissistêmica	3 (8,1%)
Doença pulmonar isolada	1 (2,7%)
Acometimento do sistema hematopoiético	3 (8,1%)
Alterações imunológicas	2 (5,4%)

Dos 25 pacientes com lesões ósseas, 17 apresentavam doença multissistêmica (68%) e oito apresentavam acometimento ósseo como única manifestação da HCL (32%). A apresentação multifocal da doença óssea foi mais comumente encontrada (72%) que a unifocal (28%). Os ossos mais frequentemente acometidos foram os do crânio (80%).

Linfadenomegalia estava presente ao diagnóstico em 17 dos 37 pacientes (45,9%). Destes, 15 (88,2%) apresentavam acometimento da cadeia cervical, sendo essa a região mais comumente afetada. O acometimento dos linfonodos ocorreu mais frequentemente em associação com outras manifestações (13 dos 17 casos ou 76,5%) do que de forma isolada (quatro casos ou 23,5%).

O acometimento cutâneo ao diagnóstico ocorreu em 17 dos 37 pacientes (45,9%). As lesões pápulo-crostosas em couro cabeludo e região inguinal foram as mais frequentemente encontradas.

Hepatomegalia como manifestação clínica inicial ocorreu em 9 dos 37 casos (24,3%). Destes, 4 apresentavam disfunção hepática. Esplenomegalia ocorreu em 7 casos e acometimento do sistema hematopoiético em três casos.

O acometimento pulmonar como parte de doença multissistêmica ocorreu em três casos. Em um caso, os pulmões foram os únicos órgãos acometidos e o paciente apresentou vários episódios de pneumotórax (Id 26).

Ao diagnóstico, quatro pacientes apresentaram *diabetes insipidus*. Desses, três apresentavam lesões osteolíticas em crânio.

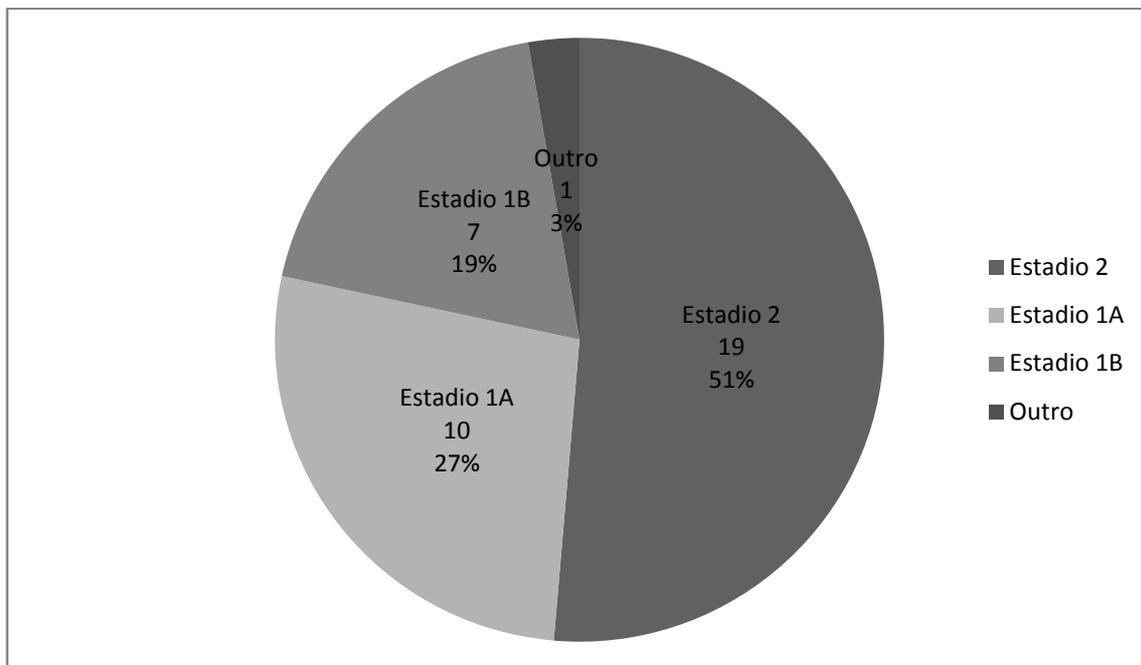
### **Estadiamento ao diagnóstico**

Ao diagnóstico, 17 pacientes (45,9%) apresentavam doença em um único sistema. Dez pacientes (27%) apresentavam doença em um único sítio, sendo classificados retrospectivamente como estadio 1A. Em um caso (Id 26), o paciente apresentou doença pulmonar isolada, mas não foi classificado quanto ao estadiamento devido à especificidade dessa manifestação. Esse caso foi excluído das análises de

sobrevida no que se refere ao estadiamento da doença. Em sete casos (18,9%), múltiplos sítios foram acometidos, e tais pacientes foram classificados como estadio 1B.

Dezenove dos 37 pacientes (51,4%) apresentavam doença multissistêmica ao diagnóstico, sendo classificados como estadio 2. Desses, seis apresentavam acometimento de pelo menos um órgão de risco (fígado, baço, pulmões ou sistema hematopoiético), todos com disfunção orgânica. A distribuição dos pacientes de acordo com seu estadiamento ao diagnóstico encontra-se representada na **figura 12**.

**Figura 12-** Distribuição dos pacientes de acordo com o estadiamento ao diagnóstico



### Resposta inicial ao tratamento

A combinação de prednisona e vimblastina foi o esquema terapêutico inicial mais comumente utilizado (17 dos 37 pacientes). Três pacientes foram submetidos ao esquema proposto pelo LCH III – braço A.

Dos 17 pacientes restantes, seis receberam VP-16, três receberam prednisona isoladamente, três foram submetidos à exérese cirúrgica da lesão, dois não receberam tratamento (conduta expectante) e três receberam tratamentos variados – o paciente de Id 23 recebeu injeção intralesional de corticóide em outro serviço; o paciente de Id 29 recebeu dois ciclos de vimblastina e prednisona, que foram suspensas por choque séptico, não tendo sido realizado nenhum tratamento adicional porque houve resolução da doença; o paciente de Id 33 recebeu inicialmente três doses de VP-16. Quatro pacientes receberam tratamento inicial em outros serviços (Id 12, 18, 23 e 24). A distribuição dos pacientes de acordo com o tratamento inicial está representada na **tabela 11**.

Para tratamento dos episódios de reativação vários esquemas de quimioterapia foram utilizados, mas sua descrição foge ao objetivo desse estudo.

**Tabela 11 - Distribuição das 37 crianças portadoras de HCL de acordo com o tratamento inicial**

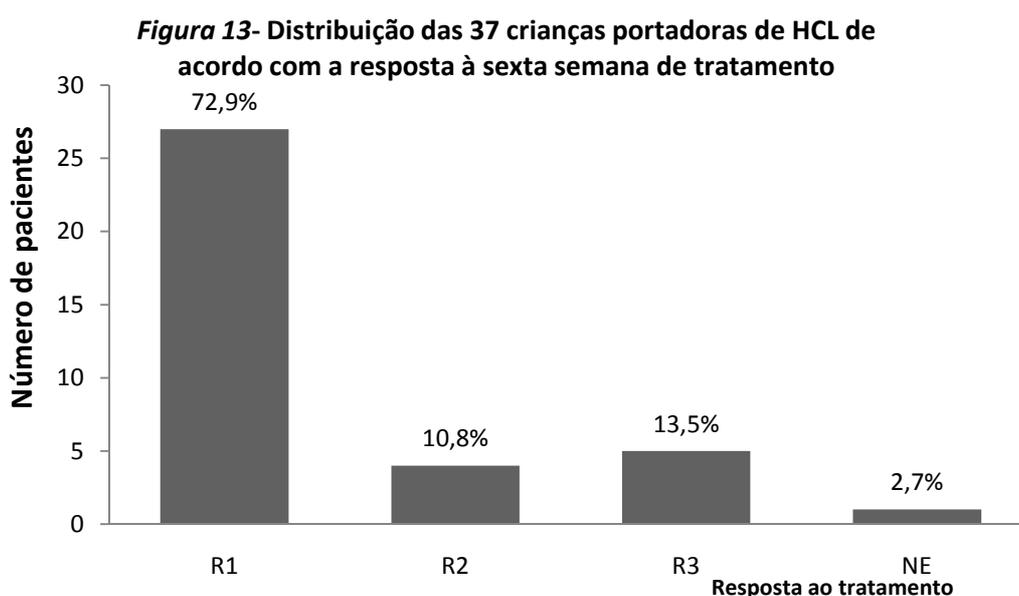
<b>Tratamento inicial</b>	<b>Número de pacientes (n e %)</b>
Vimblastina + Prednisona	17 (45,9%)
VP-16	6 (16,2%)
Protocolo LCH III	3 (8,1%)
Prednisona isoladamente	3 (8,1%)
Exérese cirúrgica	3 (8,1%)
Conduta expectante (não tratados)	2 (5,4%)
Outros	3 (8,1%)

Apenas uma paciente recebeu radioterapia como parte do esquema terapêutico inicial (Id 35). Tal paciente apresentava múltiplas lesões osteolíticas de

crânio, linfadenomegalia e *diabetes insipidus*, e a radioterapia foi dirigida à região hipotalâmica, na dose total de 900 CGy, dividida em seis sessões de 150 CGy. Dois outros pacientes foram submetidos à radioterapia (Id 5 e 14), mas como parte do tratamento de reativações.

Quando avaliados à sexta semana de tratamento, 27 pacientes (72,9%) apresentaram resposta completa (resposta “melhor”), quatro (10,8%) apresentaram resposta intermediária e cinco (13,5%) não apresentaram resposta. Em um caso, a avaliação dessa resposta não foi possível, pois a criança havia sido tratada inicialmente em outro serviço e os dados referentes à resposta ao tratamento não estavam disponíveis. Esse caso foi excluído da análise no que se refere à resposta ao tratamento.

Os pacientes que não foram tratados apresentaram resolução completa da doença. Um era portador de doença localizada na pele do tornozelo (Id 36) e o outro, HCL de um único sistema com múltiplas cadeias de linfonodos acometidas (Id 21). Nenhum deles apresentou reativação da doença. Em ambos os casos, não foi possível estabelecer o diagnóstico definitivo, permanecendo o paciente de Id 36 com diagnóstico provável e o de Id 21 com diagnóstico presuntivo. A distribuição dos pacientes de acordo com a resposta ao tratamento inicial encontra-se representada na **figura 13**.



**Legenda:** R1 = Resposta completa; R2 = resposta parcial; R3= ausência de resposta; NE= não especificado (não foi possível avaliação da resposta).

### Resposta ao tratamento de acordo com o estadiamento

Entre os pacientes com estadio 1A, oito apresentaram resposta completa ou continuada, um apresentou resposta intermediária e um não obteve resposta à sexta semana de tratamento. A paciente que não respondeu ao tratamento havia recebido injeção intralesional de corticóide em outra instituição e apresentava HCL vulvar em atividade, quando se perdeu o acompanhamento.

A paciente com doença pulmonar isolada apresentou resposta completa.

Todos os pacientes classificados no estadio 1B obtiveram resposta completa à sexta semana de tratamento. As quatro crianças que apresentavam doença óssea multifocal foram tratadas com quimioterapia sistêmica. Dentre os pacientes que apresentavam doença em linfonodos, dois receberam quimioterapia sistêmica e o terceiro estava no grupo dos não-tratados.

Dos 19 pacientes portadores de HCL multissistêmica, onze (57,8%) tiveram resposta completa, três (15,7%) tiveram resposta intermediária, quatro (21,1%) não apresentaram resposta à sexta semana de tratamento e em um caso a avaliação dessa resposta não foi possível. Dos quatro pacientes que não apresentaram resposta, três faleceram e um apresentou oito episódios de reativações, mas encontra-se vivo após 7,3 anos de acompanhamento. A resposta ao tratamento à sexta semana de acordo com o estadiamento encontra-se representada na **tabela 12**.

**Tabela 12 – Resposta à sexta semana de tratamento de acordo com o estadiamento**

Resposta à sexta semana de tratamento	Estadio 1A	Estadio 1B	Estadio 2	Total
Completa	8	7	11	26
Intermediária	1	0	3	4
Ausente	1	0	4	5
Não especificada	0	0	1*	1
Total	10	7	19	36**

\* Não foi possível avaliar a resposta à sexta semana de tratamento por falta de dados em um caso. \*\* Total de 36 casos devido à exclusão de um caso com doença pulmonar isolada, não classificado quanto ao estadiamento.

## Evolução dos pacientes

### Sobrevida global

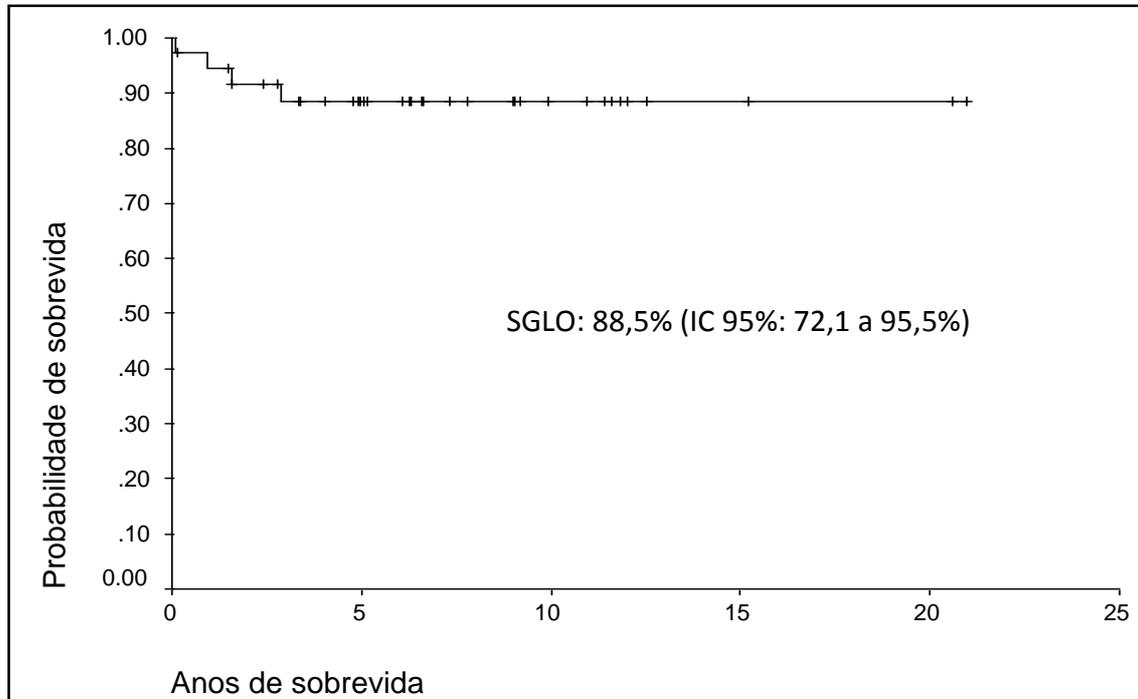
A evolução para o óbito ocorreu em quatro dos 37 casos. Todos os pacientes com tal evolução apresentavam doença multissistêmica e disfunção orgânica ao diagnóstico. Três dos quatro não apresentaram resposta à sexta semana de tratamento e permaneceram com a doença em atividade durante toda a evolução, falecendo em decorrência da progressão da doença. Um paciente (Id 8) apresentou resposta melhor à sexta semana de tratamento mas faleceu, com a doença em atividade, durante tratamento de segunda reativação. A evolução dos sete pacientes que apresentavam disfunção de órgãos ao diagnóstico encontra-se representada na **tabela 13**.

**Tabela 13: Evolução dos sete pacientes com disfunção de órgãos ao diagnóstico**

Identificação	Órgão de risco acometido	Resposta à sexta semana de tratamento	Evolução final
1	Fígado e sistema hematopoiético	Sim	Remissão
8	Sistema hematopoiético	Sim	Óbito
9	Fígado e pulmão	Não	Óbito
17	Fígado, sistema hematopoiético e pulmão	Não	Óbito
26	Pulmão	Sim	Remissão
28	Fígado e pulmão	Sim	Remissão
33	Sistema hematopoiético	Não	Óbito

A probabilidade de sobrevida global (SGLO) para todo o grupo foi de 88,5%, com intervalo de confiança a 95% (IC 95%) de 72,1 a 95,5%. A **figura 14** exibe a curva atuarial da sobrevida global para as 37 crianças.

**Figura 14 – Probabilidade de sobrevida global das 37 crianças portadoras de HCL.** As marcas sobre a curva representam o tempo de seguimento de cada um dos pacientes vivos.



A probabilidade de SGLO para os pacientes que apresentaram resposta “melhor” à sexta semana de tratamento foi 95,8% (IC 95% de 73,9 a 99,4%). Para os pacientes com resposta intermediária a probabilidade de SGLO foi de 100% e, para os sem resposta, foi de 30% (IC 95% de 1,2 a 71,9%, com  $p=0,0001$ ). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os pacientes com resposta “melhor” e os com resposta intermediária ( $p= 0,72$ ). Quando agrupados os pacientes de resposta “melhor” aos de resposta intermediária, a probabilidade de SGLO foi de 96,3% (IC 95% de 76,5 a 99,5%), significativamente maior que a de 30% do grupo sem resposta ( $p=0,0001$ ).

Com relação ao estadiamento, tanto os pacientes de estadio 1A quanto os de estadio 1B apresentaram probabilidade de SGLO de 100% sendo, portanto, agrupados em uma única categoria - a de pacientes com doença unissistêmica. A probabilidade de SGLO dos pacientes com doença multissistêmica foi de 77,2% (IC 95% de 49,7 a 90,8%), significativamente menor que a dos pacientes com doença unissistêmica ( $p=0,04$ ).

A probabilidade de SGLO entre pacientes com idade inferior a dois anos foi de 100% *versus* 82,6% (IC 95% de 59,8 a 93,1%) dos pacientes com idade superior a dois anos, diferença que não foi estatisticamente significativa ( $p=0,14$ ). Como a mediana de idade dos pacientes foi maior que dois anos (2,4 anos), também foi utilizado o ponto de corte de três anos para comparação entre os grupos. Os pacientes com idade menor que três anos tiveram probabilidade de SGLO de 85,9% (IC 95% 62,4 a 95,2%) e os maiores de três anos, de 92,3% (IC 95% 56,6% a 98,9%), diferença que também não foi significativa ( $p=0,47$ ).

Não houve diferença estatisticamente significativa na probabilidade de sobrevida global com relação ao gênero ( $p=0,96$ ). Não houve diferença estatisticamente significativa com relação ao grau de certeza diagnóstica quando consideradas as três categorias - diagnóstico definitivo, provável e presuntivo - ( $p=0,71$ ) ou quando agrupadas as categorias diagnóstico definitivo e provável e comparadas à de diagnóstico presuntivo ( $p=0,34$ ).

### **Sobrevida livre de eventos**

Dos 37 pacientes, 33 alcançaram remissão em algum momento de sua evolução, três nunca a alcançaram (Id 9, 17 e 33) e um abandonou o tratamento logo no seu início (Id 23). Dos 33 pacientes que alcançaram remissão, 20 (60,6%) apresentaram pelo menos um episódio de reativação da doença e desses, 11 apresentaram mais de um episódio. O paciente de Id 4 apresentou o maior número de episódios de reativação, num total de oito.

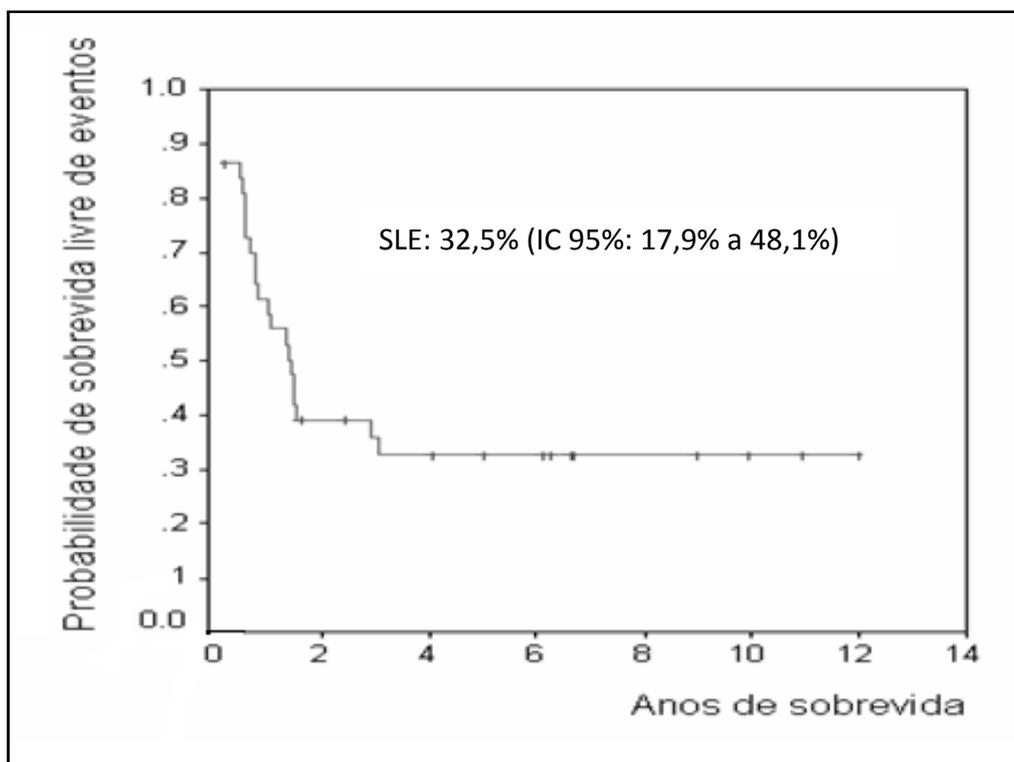
Dos dez pacientes com estadió 1A, nove apresentaram resolução completa da doença em algum momento do acompanhamento. Uma paciente abandonou o tratamento logo em seu início, com a doença em atividade. Oito dos 10 pacientes (80%) apresentaram pelo menos um episódio de reativação da doença. A paciente com doença pulmonar isolada alcançou remissão completa, sem reativações.

Dos sete pacientes com estadiu 1B, os quatro portadores de doença óssea multifocal (57,1%) apresentaram pelo menos um episódio de reativação; dos três que manifestavam doença em linfonodos, apenas um apresentou reativações.

Dos 19 pacientes com doença multissistêmica, 16 apresentaram resolução da doença em algum momento. Destes, 12 apresentaram pelo menos um episódio de reativação da doença (75%).

A probabilidade de sobrevivida livre de eventos (SLE) para todo o grupo foi de 32,5% (IC 95% 17,9 a 48,1%) aos 10 anos. A maior parte dos primeiros episódios de reativações (60%) ocorreu nos primeiros dois anos de evolução (**figura 15**).

**Figura 15 – Probabilidade de sobrevivida livre de eventos em 37 crianças portadoras de HCL.** As marcas sobre a curva representam o tempo de seguimento de cada um dos pacientes vivos, sem qualquer recaída.



A probabilidade de SLE foi de 47,1% (IC 95% de 23 a 68%) para os pacientes com doença unissistêmica e de 14,1% (IC 95% de 26 a 35,1%) para os pacientes com doença multissistêmica, diferença que não foi significativa ( $p=0,12$ ).

Quando agrupados os pacientes com resposta completa aos de resposta intermediária, a probabilidade de SLE para esse grupo foi de 38,9%. Os pacientes sem resposta à sexta semana de tratamento tiveram 0% de probabilidade de sobrevida, diferença que foi estatisticamente significativa ( $p=0,0001$ ).

Os pacientes com idade maior ou igual a três anos apresentaram probabilidade de SLE superior (45%, IC 95% de 19,4 a 67,8%) aos pacientes com idade menor que três anos (24,1%, IC 95% de 8,8 a 43,4%), com  $p=0,05$ . Não houve diferença estatisticamente significativa com relação ao gênero ( $p=0,8$ ), grau de certeza diagnóstica em três ( $p=0,39$ ) ou duas categorias ( $p=0,5$ ) ou idade menor ou maior que dois anos ( $p=0,81$ ).

### Sequelas

A presença de pelo menos uma seqüela permanente ocorreu em 15 dos 37 pacientes (40,5%). A seqüela mais comum foi o *diabetes insipidus* (DI), detectada em oito dos 37 pacientes (21,6%). Tal manifestação estava presente ao diagnóstico em quatro desses casos, desenvolvendo-se ao longo da doença nos quatro restantes. Dos oito pacientes com DI, seis apresentavam lesões ósseas cranianas ao diagnóstico.

Os tipos e número de sequelas verificadas encontram-se resumidos na **tabela 14**.

**Tabela 14 – Número e tipo de sequelas permanentes encontradas em 15 dos 37 pacientes com HCL**

<b>Sequelas</b>	<b>Número de pacientes (n e %)</b>
Diabetes insipidus	8 (21,6%)
Ao diagnóstico	4
Após diagnóstico	4
Deformidades e assimetrias	6 (16,2%)
Vértebra plana	2
Assimetria facial	2
Assimetria tórax	1
Depressão região occipital	1
Déficit auditivo	4 (10,8%)
Deficiência de hormônio do crescimento	2 (5,4%)
Cerebelite pós-radioterapia	1 (2,7%)
Encefalopatia hipóxico-isquêmica secundária à parada cardíaco-respiratória	1 (2,7%)

Um paciente desenvolveu neoplasia secundária (leucemia promielocítica aguda) dois anos e dois meses após tratamento de reativação com etoposideo (Id 22). O tratamento inicial havia sido prednisona e vimblastina e o paciente não recebeu irradiação. Atualmente encontra-se em remissão da leucemia e não apresentou outro episódio de reativação da HCL.

**Tabela 15:** Crianças portadoras de HCL tratadas no HC-UFMG no período de 1988 a 2008

Id	Idade ao diagnóstico (anos)	Gênero	Estadio	Diagnóstico antes do estudo	Diagnóstico posterior	Tratamento inicial	Resposta 6ª semana	Tempo Acompanhamento (anos)	Nº reativações	Situação atual	Sequelas
1	1,10	F	2	3 (CD1a)	3 (CD1a)	5	R2	1,58	0	Em acomp, remissão	
2	0,76	F	1B	1	3 (CD1a)	2	R1	11,83	1	Em acomp, remissão	
3	5,19	M	2	1	1	2	R1	15,21	2	Em acomp, remissão	DI+assimetria tórax+ dep crânio
4	0,61	F	2	2	2	2	R3	7,34	7	Em acomp, remissão	
5	1,54	F	2	3 (ME)	3 (ME)	3	R1	20,95	1	Alta, remissão notícia 2008	DI
6	1,99	F	2	1	3 (CD1a)	3	R1	20,57	3	Alta, remissão notícia 2008	
7	14,22	M	1A	3 (CD1a)	3 (CD1a)	1	R1	6,60	0	Transf, remissão notícia 2008	
8	9,82	M	2	3 (CD1a)	3 (CD1a)	2	R1	2,88	2	Óbito 14/07/03	Surdez
9	2,40	F	2	2	2	2	R3	1,56	Sr	Óbito 28/06/01	
10	4,98	M	1A	1	1	4	R1	5,12	1	Abandono em remissão em 2007	
11	2,26	M	1A	2	3 (CD1a)	4	R1	4,89	1	Em acomp, remissão	
12	2,17	F	2	3 (CD1a)	3 (CD1a)	2	R1	2,77	1	Em acomp, remissão	DI +GH
13	1,62	M	1A	3 (CD1a)	3 (CD1a)	1	R2	6,31	2	Em acomp, remissão	DI
14	2,79	M	1A	3 (CD1a)	3 (CD1a)	2	R1	9,05	4	Em acomp, remissão	DI+ GH+ cerebelite+ surdez
15	3,36	F	1A	1	3 (CD1a)	4	R1	6,09	0	Em acomp, remissão	Assimetria facial+ def audit
16	3,04	F	1B	1	1	2	R1	12,50	5	Em acomp, remissão	Assimetria facial
17	2,05	M	2	3 (CD1a)	3 (CD1a)	2	R3	0,08	Sr	Óbito 13/12/04	
18	1,93	M	2	1	1	2	NE	9,16	3	Transf, remissão notícia 2006	
19	2,81	F	1B	2	3 (CD1a)	2	R1	7,78	2	Em acomp, remissão	
20	16,90	M	2	2	3 (CD1a)	2	R1	5,04	1	Em acomp, remissão	
21	9,70	F	1B	1	1	0	R1	4,02	0	Abandono em remissão em 2003	
22	3,46	M	1B	3 (CD1a)	3 (CD1a)	2	R1	4,79	1	Remissão HCL, tratando LMA	LMA-M3 secundária, vért plana
23	13,91	F	1A	2	2	6	R3	1,46	Sr	Abandono com lesões ativas 2004	
24	3,15	F	1A	1	1	2	R1	10,95	0	Em acomp, remissão	
25	1,01	M	1B	2	3 (CD1a)	2	R1	4,98	0	Abandono em remissão 2006	
26	4,25	F	NE	3 (CD1a)	3 (CD1a)	2	R1	2,39	0	Transf, remissão notícia 2008	EHI secundária à PCR
27	13,79	M	1B	2	2	2	R1	9,91	0	Alta, remissão notícia 2008	
28	1,15	M	2	3 (ME)	3 (CD1a)	3	R1	3,40	1	Alta, remissão notícia 2008	Surdez
29	0,09	F	1A	2	2	6	R1	8,97	0	Em acomp, remissão	
30	1,85	M	2	1	3 (CD1a)	3	R2	3,33	1	Alta, remissão notícia 2008	
31	0,60	F	2	1	3 (CD1a)	3	R1	11,99	0	Alta, remissão notícia 2008	Vértebra plana
32	2,57	M	2	1	3 (CD1a)	1	R1	6,24	0	Alta, remissão notícia 2008	DI
33	2,29	F	2	3 (ME)	3 (ME)	6	R3	0,93	Sr	Óbito em 09/07/96	
34	2,16	F	2	2	3 (CD1a)	2	R2	11,42	5	Em acomp, remissão	DI
35	4,60	F	2	1	3 (CD1a)	3	R1	11,59	6	Alta, remissão notícia 2008	DI
36	8,19	M	1A	2	2	0	R1	6,64	0	Em acomp, remissão	
37	2,36	F	2	3 (CD1a)	3 (CD1a)	5	R1	0,16	0	Em acomp, remissão	

Id: identificação, Diagnóstico antes do estudo e posterior : 1- presuntivo 2- provável 3- definitivo (ME: microscopia eletrônica), Tratamento inicial: 0= não tratados; 1= prednisona oral; 2= vimblastina + prednisona; 3= VP-16; 4= exérese cirúrgica; 5= LCH III; 6= outros, Resposta 6ª semana: R1= resposta completa; R2= resposta intermediária; R3= resposta ausente ;NE= não especificado, Número de reativações: Sr- sem resposta ao tratamento, não alcançaram remissão em nenhum momento durante o curso da doença, Situação atual: Transf= transferência; Em acomp: em acompanhamento, Sequelas: DI- *diabetes insipidus*; GH- deficiência hormônio do crescimento; def audit- déficit auditivo ; EHI secundária à PCR – encefalopatia hipóxico-isquêmica secundária à parada cardíaco-respiratória; dep crânio- depressão crânio; vért plana – vértebra plana

#### 4. Discussão

Devido à raridade da doença e diversidade da apresentação clínica, a HCL é frequentemente subdiagnosticada. Algumas manifestações como dermatite seborreica de difícil controle, otorreia crônica e linfadenomegalia cervical isolada, por exemplo, são comuns a várias outras afecções. O diagnóstico preciso é fundamental, visto que a HCL possui baixa mortalidade, mas podem ocorrer reativações e sequelas.

O principal objetivo desse estudo foi o de confirmar o diagnóstico dos pacientes com HCL acompanhados no HC-UFMG, através da revisão de seus achados anátomo-patológicos e realização da pesquisa do antígeno de superfície CD1a nas amostras de suas biópsias anteriores. A confirmação do diagnóstico é necessária para comparação dos resultados deste estudo com os de trabalhos internacionais, que incluem apenas pacientes com diagnóstico definitivo (NARULA, et al., 2007; GADNER, et al., 2001; HISTIOCYTE SOCIETY, 2002; MINKOV, et al., 2000). Além disso, reveste-se de importância ainda maior nos casos duvidosos, como os de doença isolada em linfonodos, por exemplo.

O presente estudo possibilitou o aumento da proporção de pacientes com diagnóstico definitivo de 35% para 67,5%. Todos os exames revisados foram positivos para CD1a. Tal grau de concordância mostra a importância da realização do exame anátomo-patológico rotineiro por profissionais experientes no diagnóstico da HCL. Além disso, demonstra a eficácia e a “praticidade” da utilização da pesquisa do antígeno CD1a para confirmação da doença, que foi positiva mesmo em blocos de parafina tão antigos como os obtidos em 1988, por exemplo.

Alguns estudos também incluem pacientes com diagnóstico provável, além de pacientes com diagnóstico definitivo (MORIMOTO et al., 2006; BERNSTRAND et al., 2005). No estudo de BERNSTRAND e colaboradores (2005) é relatada a experiência de 39 anos de uma única instituição na Suécia. Foram registrados 69 pacientes. Em nove casos não foi possível a revisão das amostras, em onze não foi confirmado o diagnóstico prévio de histiocitose. Dos 49 pacientes restantes, 37 tiveram diagnóstico definitivo de HCL pela positividade do CD1a à imuno-histoquímica e 12 tiveram diagnóstico presuntivo após a revisão.

Ao final do presente estudo, 31 dos 37 pacientes (83,8%) apresentavam diagnóstico definitivo ou provável. Dos seis pacientes que permaneceram com diagnóstico presuntivo, quatro apresentavam manifestações clínicas altamente sugestivas da doença, como *diabetes insipidus* e doença multissistêmica. Em dois pacientes a única manifestação clínica encontrada era a linfadenomegalia, únicos casos em que o diagnóstico de HCL poderia ser duvidoso. Por esse motivo, nenhum caso foi excluído das análises estatísticas com base no grau de certeza diagnóstica.

A frequência de doença localizada tão somente em linfonodos (23,5% dos 17 casos com acometimento linfonodal) foi maior que a descrita pela maioria dos estudos (ARICÒ & EGELER, 1998; THE FRENCH LANGERHAN'S CELL HISTIOCYTOSIS STUDY GROUP, 1996; EDELWEISS et al., 2007). Dos quatro pacientes desse grupo, um paciente teve o diagnóstico definitivo firmado e, nos demais casos, os materiais para revisão não foram encontrados, (dois pacientes com diagnóstico presuntivo e um provável). Como em metade dos casos (2 em 4) o diagnóstico foi presuntivo, é possível que a proporção observada não reflita a realidade da casuística ou seja devida ao tamanho restrito da amostra. Nenhum dos quatro pacientes apresentou reativação da doença.

### **Características gerais da casuística**

Devido à raridade da doença, os principais estudos com análise de sobrevida que contam com grande número de casos são internacionais e multicêntricos (GADNER et al., 2001; GADNER et al., 2008; HISTIOCYTE SOCIETY, 2002; MINKOV et al., 2000; THE FRENCH LANGERHANS' CELL HISTIOCYTOSIS STUDY GROUP, 1996). A realização de estudos em instituições isoladas é importante para a comparação das características da doença numa única instituição com dados provenientes de outras instituições, e para a diminuição de vieses relacionados ao caráter multicêntrico (DONADIEU, 2005).

No presente estudo, 37 pacientes foram incluídos, número expressivo se considerados a raridade da doença e o fato de todos os casos pertencerem a uma única instituição – Hospital das Clínicas da UFMG – que é referência para o tratamento

da HCL em Minas Gerais. Estudo retrospectivo realizado em uma única instituição da Suécia avaliou 49 pacientes diagnosticados ao longo de 39 anos (BERNSTRAND et al., 2005). Estudo realizado em uma única instituição da Índia no período de Janeiro de 1987 a Dezembro de 2002 avaliou um total de 52 pacientes (NARULA et al., 2007). Estudo realizado em uma única instituição da Turquia avaliou 217 pacientes (YAĞCI et al., 2008).

A mediana do tempo de acompanhamento de 6,2 anos (1 mês – 20,9 anos) foi semelhante à descrita pela maioria dos estudos cooperativos internacionais, que relataram mediana de 5 a 7 anos (TITGEMEYER et al., 2001; MINKOV et al., 2000; CECI et al., 1993; GADNER et al., 2001; GADNER et al., 2008; MORIMOTO et al., 2006). Estudo recente de Pollono e colaboradores (POLLONO et al., 2007) mostrou que 88% dos episódios de reativação ocorreram nos primeiros dois anos de acompanhamento, sugerindo que a mediana de tempo de acompanhamento verificada neste estudo foi adequada para avaliação das reativações. Para identificação completa de sequelas permanentes, essa mediana deveria ser maior. Haupt e colaboradores (HAUPT et al., 2004) estudaram 182 pacientes com o objetivo de descrever a prevalência de sequelas permanentes. A mediana de tempo de acompanhamento foi de 10,1 anos para pacientes com doença multissistêmica e de 7 anos para os com doença unissistêmica. Os autores identificaram um risco relativo de 20,4% para o desenvolvimento de sequelas neurológicas após 14 anos de evolução da doença e concluíram que as sequelas permanentes podem desenvolver-se muitos anos após o diagnóstico, devendo o acompanhamento ser prolongado.

A mediana de idade (2,4 anos) foi compatível com a descrita pela literatura (HENTER et al., 2004; ARCECI, 1999; CARTENSEN & ORNVOLD, 1993; NICHOLSON et al., 1998; ALSTON et al., 2007; NARULA et al., 2007). Embora tenha sido verificada distribuição semelhante entre os gêneros, houve ligeiro predomínio do sexo feminino em relação ao masculino (1,2 :1), ao contrário do descrito pela maioria dos estudos, que relata proporção de 1,1 a 2 meninos para cada menina (GUYOT-GOUBIN et al., 2008; HENTER et al., 2004; ARCECI, 1999).

## Manifestações clínicas ao diagnóstico

A manifestação clínica mais comum foi o acometimento ósseo (67,6%), sendo o crânio o local mais frequentemente afetado (80% das lesões osteolíticas). Tais achados são compatíveis com os descritos pela literatura (ARICÒ & EGELER, 1998). Estudos demonstram que a doença óssea multifocal possui baixa mortalidade, mas é associada a altas taxas de reativação da doença e de sequelas (TITGEMEYER et al., 2001; JUBRAN et al., 2005; KILPATRICK et al., 1995; HOWART et al., 1999). Embora com número reduzido de pacientes para permitir comparações com tais estudos, esse trabalho mostrou um ligeiro predomínio da presença de reativações no grupo com doença óssea multifocal. Dos oito pacientes com doença óssea unissistêmica, quatro apresentavam acometimento multifocal e quatro unifocal. Todos os pacientes com doença óssea multifocal apresentaram pelo menos um episódio de reativação. Dos pacientes com doença óssea unifocal, três apresentaram pelo menos um episódio de reativação da doença e um não apresentou reativação.

Após as lesões ósseas, os sítios mais frequentemente acometidos foram pele e linfonodos, em igual proporção (45,9% cada). A literatura relata que o segundo local mais comumente acometido pela HCL é a pele, afetada em mais de um terço dos casos. Na maior parte deles (90%), ocorre em associação com a forma multissistêmica da doença, e com apresentação variável das lesões (ARICÒ & EGELER, 1998). No presente estudo, o acometimento cutâneo esteve associado à doença multissistêmica na maioria dos casos (58%). Vários tipos de lesões foram encontrados, sendo mais comuns as pápulo-crostosas.

A frequência de acometimento dos linfonodos, tanto no total de casos (17/37 = 45,9%) ou como doença unissistêmica de linfonodos, já referida (4/17 = 23,5%), foi bem superior à descrita pela maioria dos estudos, que relatam a presença dessa manifestação ao diagnóstico em apenas 10% dos casos (ARICÒ & EGELER, 1998; THE FRENCH LANGERHAN'S CELL HISTIOCYTOSIS STUDY GROUP, 1996), sendo ainda mais rara na forma isolada (EDELWEISS et al., 2007; TITGEMEYER et al., 2001). Não foi encontrada explicação satisfatória para essa taxa global tão superior à relatada pela literatura. A taxa de acometimento isolado de linfonodos foi analisada em parágrafo

anterior. Estudo retrospectivo com 52 pacientes na Índia (NARULA, et al., 2007) também verificou frequência aumentada de acometimento dos linfonodos (52% de todos os casos), semelhante ao verificado nesse estudo. A cadeia cervical foi a mais frequentemente acometida (88,2%), conforme descrito pela literatura.

O *diabetes insipidus* foi a endocrinopatia mais comum, conforme relatado pela literatura (PROSCH et al., 2004; HAUPT et al., 2004), sendo verificado como manifestação clínica ao diagnóstico em quatro pacientes. Três deles apresentavam lesões osteolíticas de crânio. Esse resultado é compatível com estudos que demonstram que lesões osteolíticas em sítios específicos como ossos da face ou da fossa craniana anterior e média, com extensão intracraniana do tumor, aumenta em até 3 vezes o risco de desenvolvimento de DI ( HISTIOCYTE SOCIETY, 2002).

Três pacientes apresentaram manifestações clínicas raras ou evolução atípica. A primeira apresentou doença localizada na vulva, forma extremamente rara em crianças (MOTTL et al., 2007), com diagnóstico aos 13,9 anos de idade. A paciente abandonou o tratamento, com as lesões ainda em atividade. A segunda apresentou doença pulmonar isolada, forma rara em crianças (HA et al., 2002; ODAME, et al., 2006). A manifestação inicial foi pneumotórax espontâneo. O lavado bronco-alveolar foi sugestivo de HCL, porém inconclusivo. O diagnóstico foi realizado por biópsia pulmonar, após vários episódios de pneumotórax. Em um desses, apresentou parada cardíaco-respiratória, evoluindo com síndrome hipóxico-isquêmica secundária. Atualmente encontra-se em remissão da HCL após tratamento de acordo com o protocolo LCH III- braço A, mas apresenta sequelas graves e permanentes secundárias à complicação descrita. A terceira paciente apresentou manifestações clínicas iniciais típicas, com lesões osteolíticas de crânio, fêmur e bacia além de linfadenomegalia retroauricular. A primeira biópsia foi compatível com processo reacional, e a paciente evoluiu com regressão espontânea quase total das lesões. Seis meses após a biópsia inicial, a paciente apresentou dor e claudicação no membro inferior esquerdo. A radiografia mostrou lesões osteolíticas de tíbia e fêmur desse membro. Nova biópsia foi realizada, que confirmou o diagnóstico. Esse caso ilustra a evolução extremamente variável da HCL e a necessidade de se acompanharem os pacientes por longos períodos e de, por vezes, realizar inúmeras biópsias até a confirmação do diagnóstico.

## **Evolução clínica**

### **Probabilidade de sobrevida global**

A probabilidade de sobrevida global para todo o grupo foi elevada (88,5%), semelhante ao descrito pela literatura (CECI et al., 1993; THE FRENCH LANGERHAN'S CELL HISTIOCYTOSIS STUDY GROUP, 1996; BERNSTRAND et al., 2005; MORIMOTO et al., 2006). Quando estratificados por grupos de risco, os pacientes com doença multissistêmica ou ausência de resposta à sexta semana de tratamento apresentaram probabilidade de SGLO significativamente menores (77,2% e 30%, respectivamente). Todos os óbitos ocorreram em pacientes com doença multissistêmica e disfunção de órgãos ao diagnóstico. Tais resultados são compatíveis com os descritos pela literatura, que consideram ausência de resposta ao tratamento inicial e disfunção de órgãos como os principais fatores associados a mau prognóstico com relação à SGLO (GADNER et al., 2001; GADNER et al., 2008; HISTIOCYTE SOCIETY, 2002; MINKOV et al., 2000). A idade inferior a dois anos também é considerada como fator de pior prognóstico com relação à SGLO (LAHEY, 1975; GADNER et al., 2001) mas acredita-se que a maior frequência de doença multissistêmica nessa faixa etária seria o verdadeiro fator prognóstico nesses casos (GADNER et al., 2008; HISTIOCYTE SOCIETY, 2002). No presente estudo, não houve diferença estatisticamente significativa com relação à idade, gênero ou grau de certeza diagnóstica.

### **Probabilidade de sobrevida livre de eventos**

A maioria dos pacientes que alcançaram remissão em algum momento (60,6%) apresentou pelo menos um episódio de reativação da doença e desses, 33% apresentaram mais de um episódio. A maior parte dos primeiros episódios de reativações (60%) ocorreu nos primeiros dois anos de evolução, conforme relatado pela literatura (POLLONO et al., 2007; MINKOV et al., 2008).

Quando estratificados por estadiamento, o grupo com doença multissistêmica apresentou frequência de reativações de 75%, muito superior à verificada nos estudos LCH I (60%), LCH II (46%) e DAL-HX (30%). Durante o período estudado, uma grande

variedade de tratamentos foi utilizada, impedindo a comparação adequada com os estudos citados mas, seguramente, a intensidade e duração do tratamento deveriam ter sido maiores nesse grupo de pacientes para que fosse obtida uma taxa menor de recaídas.

A idade abaixo de três anos foi um fator de pior prognóstico para a SLE, com probabilidade de evento significativamente inferior em relação ao grupo com mais de três anos (24,1% *versus* 45%). O tamanho pequeno da amostra impediu a realização de análise multivariada para investigar se este seria um efeito real ou, ao contrário, associado a outros fatores de prognóstico, como acometimento da função orgânica e ausência de resposta inicial.

### **Sequelas permanentes e neoplasias secundárias**

A presença de pelo menos uma sequela permanente foi verificada em 40,5% dos casos, sendo *diabetes insipidus* a mais comum (21,6%). Estudos relatam que o DI é a sequela mais comumente encontrada na HCL, com frequências que variam de 5% a 50% nos diferentes trabalhos (GROIS et al, 1998; HAUPT et al., 2004; THE FRENCH LANGERHAN'S CELL HISTIOCYTOSIS STUDY GROUP, 1996; MINKOV et al., 2000; GADNER et al., 2001; GADNER et al., 2008). Estudo recente (LAU et al., 2008) demonstrou que o DI foi a sequela mais comum entre os pacientes com doença multissistêmica (65%), enquanto as anormalidades ortopédicas e cosméticas foram responsáveis pela maioria das sequelas relatadas nos pacientes com doença unissistêmica.

Houve um caso de neoplasia secundária. O paciente desenvolveu leucemia promielocítica aguda (LMA-M3) dois anos e nove meses após tratamento de reativação com etoposídeo. O desenvolvimento de neoplasias secundárias é relatado pela literatura e a causa para seu desenvolvimento ainda não é totalmente esclarecida. Postula-se que poderia estar relacionada ao uso de etoposídeo ou que a própria HCL seria associada a uma maior susceptibilidade para o desenvolvimento de neoplasias

(HOWART et al., 1999; EGELER et al., 1998; DE CAMARGO et al., 1993; LOPES & DE CAMARGO, 1999).

A maioria dos pacientes com sequelas apresentava doença multissistêmica (60%), conforme o relatado pela literatura (ARCECI et al., 1999; LAU et al., 2008) e, dentre todos os pacientes com doença multissistêmica, 47,4% apresentaram pelo menos uma sequela permanente. Essa frequência foi semelhante à de 51% relatada pelo estudo LCH I (GADNER et al., 2001) e maior que a de 38% do DAL-HX (MINKOV et al., 2000) e a de 37% do LCH II (GADNER et al., 2008). A presença de sequelas pode ocorrer ao diagnóstico ou até 14 anos após o mesmo (POLLONO et al., 2007). No presente estudo, o maior tempo verificado entre o diagnóstico e o desenvolvimento de sequela (cerebelite pós-radioterapia) foi de 7 anos e 7 meses. Tais achados demonstram a necessidade de acompanhamento prolongado dos pacientes com HCL.

### **Limitações**

As principais limitações desse estudo são referentes à sua natureza retrospectiva. Os dados anotados nos prontuários são frequentemente incompletos, podendo falsear alguns resultados. Isso foi minimizado devido ao fato de os orientadores do estudo terem participado diretamente do diagnóstico e acompanhamento da maioria dos pacientes, possibilitando o esclarecimento dos dados que seriam duvidosos pelo registro inadequado dos mesmos. Alguns pacientes foram tratados inicialmente em outros serviços, e os dados referentes ao tratamento anterior foram, por vezes, incompletos. No único caso em que a falta de dados sobre a resposta ao tratamento prejudicou a análise, tal paciente foi excluído da mesma.

O ideal seria que todas as biópsias sem diagnóstico definitivo prévio fossem revisadas. Isso não foi possível porque 12 amostras não foram encontradas. Na maioria dos casos, o motivo pelo qual elas não estavam disponíveis foi o local de sua realização (em outras instituições), e o ano em que foram realizadas, não sendo armazenadas amostras antigas em outros serviços. Em outros estudos retrospectivos também não foi possível a revisão das biópsias de todos os pacientes. Em estudo brasileiro

(KUCZINSKI et al., 2000) foram procuradas as amostras de 20 pacientes com diagnóstico prévio de HCL na tentativa de estabelecer o diagnóstico definitivo por meio da pesquisa de CD1a. Em metade dos casos não havia material disponível para revisão. Em estudo realizado na Suécia não foi possível a revisão de 9 amostras de um total de 69 pacientes (BERNSTAND et al., 2005)

## 5. Conclusões

- 1) O estudo possibilitou a melhora da certeza diagnóstica, com a maioria dos pacientes apresentando diagnóstico definitivo e a quase totalidade diagnóstico definitivo ou provável após a sua realização.
- 2) O diagnóstico definitivo por meio da pesquisa de CD1a é ideal para a revisão de materiais embebidos em parafina, mantendo sua efetividade mesmo em amostras antigas.
- 3) A realização do exame anátomo-patológico por patologista experiente no diagnóstico da HCL é fundamental, o que foi demonstrado pela total correspondência entre os achados histológicos anteriores e a positividade para CD1a nos casos revisados.
- 4) As estimativas de sobrevida global e de sobrevida livre de eventos (óbito, reativação) foram semelhantes aos de estudos multicêntricos internacionais.
- 5) A frequência de reativações para os pacientes com doença multissistêmica foi maior que a descrita pela literatura.
- 6) Os principais fatores de mau prognóstico com relação à SGLO foram doença multissistêmica e ausência de resposta à sexta semana de tratamento. Todos os pacientes que faleceram apresentavam doença multissistêmica e disfunção de órgãos ao diagnóstico. Não foi verificada influência negativa da idade menor que dois anos na SGLO. O grau de certeza diagnóstica não influenciou a SGLO.
- 7) Os pacientes com doença multissistêmica apresentaram maior frequência de sequelas permanentes, algumas de aparecimento vários anos após o diagnóstico. O acompanhamento por longos períodos é necessário para identificação de sequelas tardias.

## Referências Bibliográficas

- Abla O, Weitzman S, Minkov M, McClain KL, Visser J, Filipovich A, Grois N. Diabetes Insipidus in Langerhans Cell Histiocytosis: When Is Treatment Indicated? *Pediatr Blood Cancer* 2009; 52(5): 555-556.
- Alston RD, Tatevossian RG, McNally RJ, Kelsey A, Birch JM, Eden TO. Incidence and Survival of Childhood Langerhans Cell Histiocytosis in Northwest England From 1954 to 1998. *Pediatr Blood Cancer* 2007; 48(5): 555-560.
- Anderson JM. Multinucleated giant cells. *Curr Opin Hematol* 2000; 7(1): 40-47.
- Annels NE, Da Costa CE, Prins FA, Willenze A, Hogendoorn PC, Egeler RM. Aberrant Chemokine Receptor Expression and Chemokine Production by Langerhans Cells Underlies the Pathogenesis of Langerhans Cell Histiocytosis. *J Exp Med* 2003; 197 (10): 1385–1390.
- Apollonsky N, Lipton J. Treatment of Refractory Langerhans Cell Histiocytosis (LCH) With a Combination of 2-Chlorodeoxyadenosine and Cytosine Arabinoside. *J Pediatr Hematol Oncol* 2009; 31(1): 53-56.
- Arceci RJ. The Histiocytosis: The Fall of the Tower of Babel. *Eur J Cancer* 1999; 35(5): 747-769.
- Aricò M, Danesino C. Langerhans' cell histiocytosis: is there a role for genetics? *Haematologica* 2001; 86(10): 1109-1014.
- Aricò M, Egeler R. Clinical aspects of Langerhans cell histiocytosis. *Hematol Oncol Clin North Am* 1998; 12(2): 247-258.
- Aricò M, Collela R, Conter V, Indolfi P, Pession A, Santoro N, et al. Cyclosporine therapy for refractory Langerhans cell histiocytosis. *Med Pediatr Oncol* 1995; 25(1): 12-16.
- Azouz E, Saigal G, Rodriguez M, Podda A. Langerhans' cell histiocytosis: pathology, imaging and treatment of skeletal involvement. *Pediatr Radiol* 2005; 35(2): 103-115.
- Banchereau J, Steinman R. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998; 392 (6673): 245-252.
- Barthez M, Araujo E, Donadieu J. Langerhans cell histiocytosis and the central nervous system in childhood: evolution and prognostic factors. Results of a collaborative study. *J Child Neurol* 2000; 15(3): 150-156.
- Batey C, Samayoa L. Progressive langerhans' cell histiocytosis presenting as a primary penile lesion. *J Urol* 2002; 167(3): 1433-1434.
- Bernard F, Thomas C, Bertrand Y, Munzer M, Parker J, Ouache M, et al. Multi-centre pilot study of 2-chlorodeoxyadenosine and cytosine arabinoside combined chemotherapy in refractory Langerhans cell histiocytosis with haematological dysfunction. *Eur J Cancer* 2005; 41(17): 2682-2689.

Bernstrand C, Sandstedt B, Åhström L, Henter J.-I. Long-term follow-up of Langerhans cell histiocytosis: 39 years' experience at a single centre. *Acta Paediatr* 2005; 94(8): 1073-1084.

Betts D, Leibundgut K, Feldges A, Plüss H, Niggli F. Cytogenetic abnormalities in Langerhans cell histiocytosis. *Br J Cancer* 1998; 77(4): 552-555.

Bhatia S, Nesbit M, Egeler R, Buckley J, Mertens A, Robison L. Epidemiologic Study of Langerhans Cell Histiocytosis in Children. *J Pediatr* 1997; 130(5): 774-784.

Binkovitz L, Olshefski R, Adler B. Coincidence FDG-PET in the evaluation of Langerhans' cell histiocytosis: preliminary findings. *Pediatr Radiol* 2003; 33(9): 598-602.

Biswas G, Khadwal A, Arora B, Bhagwat R, Banavali S, Nair C, et al. Activity and toxicity of 2-CDA in Langerhans cell histiocytosis: a single institutional experience. *Indian J Cancer* 2007; 44(4): 137-141.

Boenisch T. Basic enzymology. In: Key M, editor. *Education guide: Immunohistochemical staining methods* 4th ed. California: Dako; 2006. p. 19-26.

Braier J, Ciocca M, Latella A, de Davila M, Drajer M, Imventarza O. Cholestasis, sclerosing cholangitis, and liver transplantation in Langerhans cell histiocytosis. *Med Pediatr Oncol* 2002; 38(3): 178-182.

Braier J, Latella A, Balancini B, Castaños C, Goldberg J. Outcome in children with pulmonary Langerhans cell histiocytosis. *Pediatr Blood Cancer* 2004; 43(7): 765-769.

Braier J, Latella A, Balancini B, Castaños C, Goldberg J. Isolated pulmonary Langerhans cell histiocytosis presenting with recurrent pneumothorax. *Pediatr Blood Cancer* 2007; 48(2): 241-244.

Broadbent V, Egeler R, Nesbit ME Jr. Langerhans Cell Histiocytosis - clinical and epidemiological aspects. *Br J Cancer Suppl* 1994; 70(23): S11-S16.

Campos MK, Viana MB, Oliveira BM, Ribeiro DD, Silva CM. Histiocitose de células de Langerhans: experiência de 16 anos. *Jornal de Pediatria* 2007; 83(1): 79-86.

Cappello F, Rappa F, Bucchieri F, Zummo G. CD1a: a novel biomarker for Barrett's metaplasia? *Lancet Oncol* 2003; 4(8): 497.

Cartensen H, Ornvold K. The epidemiology of Langerhans cell histiocytosis in children in Denmark, 1975-89. *Med Pediatr Oncol* 1993; 21: 387-388.

Caselli D, Aricò M. The role of BMT in childhood histiocytoses. *Bone Marrow Transplant* 2008; 41(Suppl 2):S8-S13.

Ceci A, Terlizzi M, Colella R, Loiacono G, Balducci D, Surico G, et al. Langerhans cell histiocytosis in childhood: results from the Italian Cooperative AIEOP-CNR-H.X'83 study. *Med pediatr oncol* 1993; 21: 259-264.

Chikwava K, Jaffe R. Langerin (CD207) staining in normal pediatric tissues, reactive lymph nodes, and childhood histiocytic disorders. *Pediatr Dev Pathol* 2004; 7(6): 607-614.

Chu T, Jaffe R. The normal Langerhans Cell and the LCH cell. *Br J Cancer Suppl* 1994; 23:S4-S10.

Coppes-Zantinga A, Egeler R. The Langerhans Cell Histiocytosis X Files Revealed. *Br J Haematol* 2002; 116(1): 3-9.

Costa CE, Annels NE, Faaij CM, Forsyth RG, Hogendoorn PC, Egeler RM. Presence of osteoclast-like multinucleated giant cells in the bone and nonostotic lesions of Langerhans cell histiocytosis. *J Exp Med* 2005; 201(5): 687-693.

Coventry B, Heinzel S. CD1a in human cancers: a new role for an old molecule. *Trends Immunol* 2004; 25(5): 242-248.

De Camargo B, Alves AC, Gorender EF, Bianchi A. Association of Malignancy and Langerhans' Cell Histiocytosis: Report of Three Cases. *Med Pediatr Oncol* 1993; 21(6): 451-453.

De Juli, E, Allen M, Aricò M. Pulmonary LCH 2007. [site Internet] [Citado em 24 mai.2009].Disponível em: [http://www.histio.org/site/c.kiKTL4PQLvF/b.1851561/k.9C02/Pulmonary\\_LCH.htm](http://www.histio.org/site/c.kiKTL4PQLvF/b.1851561/k.9C02/Pulmonary_LCH.htm)

Dimentberg RA, Brown KL. Diagnostic evaluation of patients with histiocytosis X. *J Pediatr Orthop* 1990; 10(6): 733-741.

Donadieu J. A single-centre study can improve our knowledge of a rare disease! As exemplified by studies in Langerhans' cell histiocytosis. *Acta Paediatr* 2005; 94(8): 1010-1011.

Donadieu J, Piguet C, Bernard F, Barkaoui M, Ouache M, Bertrand Y, et al. A new clinical score for disease activity in Langerhans cell histiocytosis. *Pediatr Blood Cancer* 2004; 43(7): 770-776.

Donadieu J, Rolon MA, Pion I, Thomas C, Doz F, Barkaoui M, et al. Incidence of Growth Hormone deficiency in pediatric-onset Langerhans cell histiocytosis: efficacy and safety of Growth Hormone treatment. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89(2): 604-609.

Dziegiel P, Dolinska-Krajewska B, Dumanska M, Weclawek J, Jelén M, Podhorska- Okolów M, et al. Coexpression of CD1a, langerin and Birbeck's granules in Langerhans cell histiocytosis (LCH) in children: ultrastructural and immunocytochemical studies. *Folia Histochem Cytobiol* 2007; 45(1): 21-25.

Edelweiss M, Medeiros LJ, Suster S, Moran CA. Lymph node involvement by Langerhans cell histiocytosis:a clinicopathologic and immunohistochemical study of 20 cases. *Human Pathol* 2007; 38(10): 1463-1469.

Egeler RM, D'angio GJ. Medical progress: Langerhans Cell Histiocytosis. *J Pediatr* 1995; 127(1): 1-11.

Egeler RM, Annels NE, Hogendoorn PC. Langerhans Cell Histiocytosis: a pathologic combination of oncogenesis and immune dysregulation. *Pediatr Blood Cancer* 2004; 42(5): 401-403.

Egeler RM, de Kraker J, Voûte PA. Cytosine-Arabinoside, vincristine, and prednisolone in the treatment of children with disseminated Langerhans cell histiocytosis with organ dysfunction: experience at a single institution. *Med Pediatr Oncol* 1993; 21(4): 265-270.

Egeler RM, Neglia J, Aricò M, Favara BE, Heitger A, Nesbit ME, et al. The relation of Langerhans cell histiocytosis to acute leukemia, lymphomas, and other solid tumors. *Hematol Oncol Clin North Am* 1998; 12(2): 369-377.

Emile JF, Wechsler J, Brousse N, Boulland M, Cologon R, Fraitag S, et al. Langerhans' Cell Histiocytosis: definitive diagnosis with the use of monoclonal antibody O10 on Routinely paraffin-embedded samples. *Am J Surg Pathol* 1995 ; 19(6): 636-641.

Fadeel B, Henter JI. Langerhans cell histiocytosis: neoplasia or unbridled inflammation? *Trends Immunol* 2003; 24(8): 409-410.

Favara BE, Jaffe R. The Histopathology of Langerhans Cell Histiocytosis. *Br J Cancer* 1994; 70 Suppl 23: S17-S23.

Favara BE, Feller AC, Pauli M, Jaffe ES, Weiss L, Aricò M, et al. Contemporary Classification of Histiocytic Disorders. *Med Pediatr Oncol* 1997; 29(3): 157-166.

Ferreira L, De Carvalho J, Pereira S, Tavares M. Histiocytosis X of the temporal bone. *Rev Bras Otorrinolaringol* 2006; 72(4): 575.

Fithian E, Jung P, Goldstein G, Rubinfeld M, Fenoglio C, Edelson R. Reactivity of Langerhans cells with hybridoma antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981; 78(4): 2541-2544.

Gadner H, Grois N, Arico M, Broadbent V, Ceci A, Jakobson A, et al. A randomized trial of treatment for multisystem Langerhans' cell histiocytosis. *J Pediatr* 2001; 138(5): 728-734.

Gadner H, Grois N, Pötschger U, Minkov M, Aricò M, Braier J, et al. Improved outcome in multisystem Langerhans cell histiocytosis is associated with therapy intensification. *Blood* 2008; 111(5): 2256-2562.

Gadner H, Heitger A, Grois N, Gatterer-Menz I, Ladisch S. Treatment strategy for disseminated Langerhans cell histiocytosis. DAL HX-83 Study Group. *Med Pediatr Oncol* 1994; 23(2): 72-80.

Geissmann F, Lepelletier Y, Fraitag S, Valladeau J, Bodemer C, Debré M, et al. Differentiation of Langerhans Cell in Langerhans Cell Histiocytosis. *Blood* 2001; 97(5): 1241-1248.

Ghanem I, Tolo VT, D'Ambra P, Malogalowkin MH. Langerhans cell histiocytosis of bone in children and adolescents. *J Pediatr Orthop* 2003; 23(1): 124-130.

Gogusev J, Nezelof C. Malignant histiocytosis. Histologic, cytochemical, chromosomal, and molecular data with a nosologic discussion. *Hematol Oncol Clin North Am* 1998; 12(2): 445-463.

Goo HW, Yang DH, Ra YS, Song JS, Im HJ, Seo JJ, et al. Whole-body MRI of langerhans cell histiocytosis: comparison with radiography and bone scintigraphy. *Pediatr Radiol* 2006; 36(10): 1019-1031.

Grois NG, Favara BE, Mostbeck GH, Prayer D. Central nervous system disease in Langerhans cell histiocytosis. *Hematol Oncol Clin North Am* 1998; 12(2): 287-304.

Grois N, Prayer D, Prosch H, Lassmann H. ; CNS-LCH Co-operative Group. Neuropathology of CNS disease in Langerhans cell histiocytosis. *Brain* 2005; 128 (Pt 4): 829-838.

Guthery SL, Heubi JE. Liver involvement in childhood histiocytic syndromes. *Curr Opin gastroenterol* 2001; 17(5): 474-478.

Guyot-Goubin A, Donadieu J, Barkaoui M, Bellec S, Thomas C, Clavel, J. Descriptive Epidemiology of Childhood Langerhans Cell Histiocytosis in France, 2000-2004. *Pediatr Blood Cancer* 2008; 51(1): 71-75.

Ha SY, Helms P, Fletcher M, Broadbent V, Pritchard J. Lung involvement in Langerhans cell histiocytosis: prevalence, clinical features and outcome. *Pediatrics* 2002; 89(3): 466-469.

Hamre M, Hedberg J, Buckley J, Bhatia S, Finlay J, Meadows A, et al. Langerhans Cell Histiocytosis: An Exploratory Epidemiologic Study of 177 Cases. *Med Pediatr Oncol* 1997; 28(2): 92-97.

Hart, DN. Dendritic Cells: Unique Leukocyte Populations Which Control the Primary Immune Response. *Blood* 1997; 90(9): 3245-3287.

Haupt R, Nanduri V, Calevo MG, Bernstrand C, Braier JL, Broadbent V, et al. Permanent consequences in Langerhans cell histiocytosis patients: a pilot study from the Histiocyte Society - late effects study group. *Pediatr Blood Cancer* 2004 ; 42(5): 438-444.92

Henter JI, Tondini C, Pritchard J. Histiocyte disorders. *Crit Rev Oncol Hematol* 2004; 50(2): 157-174.

Henter J-I, Aricò M, Elinder G, Imashuku S, Janka G. Familial Hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Hematol Oncol Clin North Am* 1998; 12(2): 417-434.

Henter J-I, Elinder G, Öst A. Diagnostic guidelines for hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Seminar in oncology* 1991; 18(1): 29-33.

Henter J-I, Horne A, Aricò M, Egeler RM, Filipovich AH, Imashuku S, et al. HLH-2004: Diagnostic and therapeutic guidelines for Hemophagocytic Lymphohistiocytosis. *Pediatr Blood Cancer* 2007; 48(2): 124-131.

Hillenbrand EE, Neville AM, Coventry BJ. Immunohistochemical localization of CD1a-positive putative dendritic cells in human breast tumours. *Brit J Cancer* 1999 ; 79 (5-6): 940-944.

Histiocyte Society 2009. Langerhans cell histiocytosis: Evaluation and Treatment Guidelines.

Histiocyte Society 2008 [site da internet] [citado em 24 mai.2009]. Disponível em [http://www.histiocytesociety.org/site/c.mqISL2PIrH/b.4946471/k.11E4/2008\\_Study\\_Group\\_Reports.htm](http://www.histiocytesociety.org/site/c.mqISL2PIrH/b.4946471/k.11E4/2008_Study_Group_Reports.htm)

Histiocyte Society 2003. LCH CNS 2003: Registry and diagnostic guidelines for central nervous system disease in langerhans cell histiocytosis.

Histiocyte Society 2002. Treatment protocol of the third international study for Langerhans cell histiocytosis.

Howart DM, Gilchrist GS, Mullan BP, Wiseman GA, Edmonson JH, Schomberg PJ. Langerhans cell histiocytosis: diagnosis, natural history, management, and outcome. *Cancer* 1999 85(10): 2278-2290.

Huang F, Arceci R. The Histiocytoses of Infancy. *Seminars in Perinatology* 1999; 23(4): 319-331.

Hunger RE, Sieling PA, Ochoa MT, Sugaya M, Burdick AE, Rea TH, et al. Langerhans cells utilize CD1a and langerin to efficiently present nonpeptide antigens to T cells. *J Clin Invest* 2004; 113(5): 701-708.

Jeziorski E, Senechal B, Molina TJ, Devez F, Leruez-Ville M, Morand P, et al. Herpes-Virus Infection in Patients with Langerhans Cell Histiocytosis: A Case-Controlled Seroprevalence Study, and In Situ Analysis. *PLoS ONE* 2008; 3(9): e3262.

Jubran RF, Marachelian A, Dorey F, Malogolowkin M. Predictors of outcome un children with Langerhans cell histiocytosis. *Pediatr Blood Cancer* 2005; 45(1): 37-42.

Kannourakis G, Abbas A. The role of cytokines in the pathogenesis of Langerhans Cell Histiocytosis. *Brit J Cancer Suppl* 1994; 23: S37-S40.

Kaplan KJ, Goodman ZD, Ishak KG. Liver involvement in Langerhans cell histiocytosis: a study of nine cases. *Mod Pathol* 1999; 12(4): 370-378.

Key M. Immunohistochemistry staining methods. In: Key M, editor. *Education guide: Immunohistochemical staining methods* 4th ed. California: Dako; 2006. p. 47-54).

Key M, Boenisch T. Antigen retrieval. In: Key M, editor. *Education guide: Immunohistochemical staining methods* 4th ed. California: Dako; 2006. p. 41-45).

Khadilkar UN, Rao AT, Sahoo KK, Pai M. Langerhans cell histiocytosis of the mediastinal node. *Indian Journal of Pediatrics* 2008; 75(3): 294-296.

Kilpatrick SE, Wenger DE, Gilchrist GS, Shives TC, Wollan PC, Unni KK. Langerhans' cell histiocytosis (Histiocytosis X) of bone. *Cancer* 1995; 76(12): 2471-2484.

Krenács L, Tiszalvicz L, Boumsell L. Immunohistochemical detection of CD1a antigen in formalin fixed and paraffin embedded tissue sections with monoclonal antibody 010. *J Pathol* 1993; 171(2): 99-104.

Kuczynski AP, Zerbini MCN, Gugelmin ES, Filho VO. Estudo retrospectivo de 20 crianças com Histiocitose das células de Langerhans. *Pediatrics (São Paulo)* 2000; 22(4): 312-318.

Kumary PK, Priyakumari T, Chellam VG, James FV, Nair MK. Langerhans cell histiocytosis in children less than 2 years of age. *Indian Pediatr* 1999; 36(1): 29-36.

La Rocca G, Anzalone R, Bucchieri F, Farina F, Cappello F, Zummo G. CD1a and antitumour immune response. *Immunol Lett* 2004; 95(1): 1-4.

Ladisch S, Gadner H, Aricò M, Broadbent V, Grois N, Jacobson A, et al. LCH-I: A Randomized Trial of Etoposide Vs. Vinblastine in Disseminated Langerhans Cell Histiocytosis. *Med Pediatr Oncol* 1994; 23(2): 107-110.

Lahey, M. Histiocytosis X: an analysis of prognostic factors. *J Pediatr* 1975, 87(2): 184-189.

Lau LM, Stuurman K, Weitzman S. Skeletal Langerhans cell Histiocytosis in children: permanent consequences and health-related quality of life in long-term survivors. *Pediatr Blood Cancer* 2008; 50(3): 607-612.

Lau SK, Chu PG, Weiss LM. Immunohistochemical expression of Langerin in Langerhans cell histiocytosis and non-Langerhans cell histiocytic disorders. *Am J Surg Pathol* 2008; 32(4): 615-619.

LCH-HCT Study Group of the Histiocyte Society 2006. Reduced intensity hematopoietic cell transplantation for patients with resistant Langerhans cell histiocytosis- LCH-HCT-2006.

Leahy MA, Krejci SM, Friednash M, Stockert SS, Wilson H, Huff JC, Weston WL, Brice SL. Human Herpesvirus 6 is present in lesions of Langerhans cell histiocytosis. *J Invest Dermatol* 1993; 101(5): 642-645.

Lollar K, Farrag TY, Cao D, Niparko J, Tufano RP. Langerhans cell histiocytosis of the thyroid gland. *Am J Otolaryngol* 2008; 29(3): 201-204.

Longaker MA, Frieden IJ, LeBoit PE, Sherertz EF. Congenital "self-healing" langerhans cell histiocytosis: the need for long-term follow-up. *J Am Acad Dermatol* 1994; 31(5 pt 2): 910-916.

Lopes L, De Camargo B. Letter to the Editor: Secondary Acute Promyelocytic Leukemia After Treatment With Etoposide for Langerhans Cell Histiocytosis (LCH). *Med Pediatr Oncol* 1999, p. 315.

Lourenço SV, Silva MA, Nico MM. An ulcer on the lip. *Clin Exp Dermatol* 2005; 30(2): 199-200.

Mahmoud HH, Wang, WC, Murphy SB. Cyclosporine therapy for advanced Langerhans cell histiocytosis . *Blood* 1991; 77(4): 721-725.

Martin-Duverneuil N, Idbaih A, Hoang-Xuan K, Donadieu J, Genereau T, Guillevin R, et al. MRI features of neurodegenerative Langerhans cell histiocytosis. *Eur Radiol* 2006; 16(9): 2074-2082.

Mataix J, Betlloch I., Lucas-Costa A, Pérez-Crespo M, Moscardó-Guilleme C. Nail Changes in Langerhans Cell Histiocytosis: A Possible Marker of Multisystem Disease. *Pediatr Dermatol* 2008; 25(2): 247-251.

Mc Clain K, Natkunam Y, Swerdlow S. Atypical Cellular Disorders. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2004: 283-296.

McClain K, Jin H, Gresik V, Favara, B. Langerhans cell histiocytosis: lack of a viral etiology. *Am J Hematol* 1994; 47(1): 16-20.

McLelland J, Chu AC. Comparison of peanut agglutinin and S100 stains in the paraffin tissue diagnosis of Langerhans cell histiocytosis. *Brit J Dermatol* 1988; 119(4): 513-519.

Miller R, Kubier P, Reynolds B, Henry T, Turnbow H. Blocking of endogenous avidin-binding activity in immunohistochemistry. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 1999; 7(1): 63-65.

Minkov M, Grois N, Heitger A, Pötschger U, Westermeier T, Gadner H, for the DAL-HX Study Group. Response to initial treatment of multisystem Langerhans cell histiocytosis: an important prognostic indicator. *Med Pediatr Oncol* 2002; 39(6): 581-585.

Minkov M, Grois N, Braier J, Rosso D, Aricò M, Broadbent V, et al. Immunosuppressive treatment for chemotherapy-resistant multisystem Langerhans cell histiocytosis. *Med Pediatr Oncol* 2003;40(4): 253-256.

Minkov M, Grois N, Broadbent V, Ceci A, Jakobson A, Ladisch S, et al. Cyclosporine A therapy for multisystem Langerhans cell hitiocytosis. *Med Ped Oncol* 1999; 33(5): 482-485.

Minkov M, Grois N, Heitger A, Pötschger U, Westermeier T, Gadner H, et al. Treatment of multisystem Langerhans cell histiocytosis. Results of the DAL-HX 83 e DAL-HX 90 studies. *Klin Padiatr* 2000; 212(4): 139-144.

Minkov M, Steiner M, Pötschger U, Aricò M. Reactivations in Multisystem Langerhans Cell Histiocytosis: Data of the International LCH Registry. *J Ped* 2008; 153(5): 700-705.

Moody DB, Besra GS, Wilson IA, Porcelli SA. The molecular basis of CD1- mediated presentation of lipid antigens. *Immunol Rev* 1999; 172: 285-296.

Moody DB, Reinhold BB, Guy MR, Beckman EM, Frederique DE, Furlong ST, Ye S, et al. Structural Requirements for Glycolipid Antigen Recognition by CD1b-Restricted T Cells. *Science* 1997; 278(5336): 9283-286.

Moody DB, Ulrichs T, Mühlecker W, Young DC, Gurcha SS, Grant E, et al. CD1c-mediated T-cell recognition of isoprenoid glycolipids in *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Nature* 2000; 404(6780): 884-888.

Morimoto A, Ikushima S, Kinugawa N, Ishii E, Kohdera U, Sako M, et al. Improved Outcome in the Treatment of Pediatric Multifocal Langerhans Cell Histiocytosis: Results from the Japan Langerhans Cell Histiocytosis Study Group-96 Protocol Study. *Cancer* 2006; 107(3): 613-619.

Mottl H, Rob L, Stary J, Kodet R, Drahekoupilova E.. Langerhans cell histiocytosis of vulva in adolescent. *Int J Gynecol Cancer* 2007; 17(2): 520-524.

Müller J, Garami M, Hauser P, Schuler D, Csòka M, Kovács G, et al. Hungarian Experience with Langerhans Cell Histiocytosis in Childhood. *Pediatr Hematol Oncol* 2006; 23(2): 135-142.

Munn S, Chu AC. Langerhans cell histiocytosis of the skin. *Hematol Oncol Clin North Am* 1998; 12(2): 269-284.

Nanduri VR, Pritchard J, Levitt G, Glaser AW. Long term morbidity and health related quality of life after multisystem Langerhans cell histiocytosis. *Eur J Cancer* 2006; 42(15): 2563-2569.

Narula G, Bhagwat R, Arora B, Banavali S, Pai S, Nair C, et al. Clinico- Biologic profile of Langerhans cell histiocytosis: a single institutional study. *Indian J Cancer* 2007; 44(3): 93-98.

Newman B, Hu W, Nigro K, Gilliam A. Aggressive histiocytic disorders that can involve the skin. *J Am Acad Dermatol* 2007; 56(2): 302-316.

Nezelof C, Basset F. An hypothesis Langerhans Cell Histiocytosis: the failure of the immune system to switch from an innate to an adaptive mode. *Pediatr Blood Cancer* 2004; 42(5): 398-400.

Nezelof C, Basset F. Langerhans Cell Histiocytosis research: past, present and future. *Hematol Oncol Clin North Am* 1998; 12(2): 385-406.

Nicholson HS, Egeler RM, Nesbit ME. The Epidemiology of Langerhans Cell Histiocytosis. *Hematol Oncol Clin North Am* 1998; 12(2): 379-384.

Odame I, Li P, Lau L, Doda W, Noseworthy M, Babyn P, Weitzman S. Pulmonary Langerhans cell histiocytosis: a variable disease in childhood. *Pediatr Blood Cancer* 2006; 47(7): 889-893.

Ottaviano F, Finlay J. Diabetes Insipidus and Langerhans Cell Histiocytosis: A Case Report of Reversibility With 2-Chlorodeoxyadenosine. *J Pediatr Hematol Oncol* 2003; 25(7): 575-577.

Pace GE. Ancillary methods in immunohistochemistry. In: Key M, editor. *Education guide: Immunohistochemical staining methods* 4th ed. California: Dako; 2006. p. 71-87.

Pardanani A, Phyliky RL, Li CY, Tefferi A. 2-Chlorodeoxyadenosine Therapy for Disseminated Langerhans Cell Histiocytosis. *Mayo Clin Proc* 2003; 78:301-306.

Phillips M, Allen C, Gerson P, McClain K. Comparison of FDG-PET Scans to Conventional Radiography and Bone Scans in Management of Langerhans Cell Histiocytosis. *Pediatr Blood Cancer* 2009; 52(1): 97-101.

Pollono D, Rey G, Latella A, Rosso D, Chantada G, Braier J. Reactivation and risk of sequelae in Langerhans cell histiocytosis. *Pediatr Blood Cancer* 2007; 48: 696-699.

Porcelli S, Brenner MB, Greenstein JL, Terhorst C, Balk SP, Bleicher PA. Recognition of cluster of differentiation 1 antigens by human CD4- CD8<- cytolytic T lymphocyte. *Nature* 1989; 341: 447-450.

Prayer D, Grois N, Prosch H, Gadner H, Barkovich, J. MR Imaging Presentation of Intracranial Disease Associated with Langerhans Cell Histiocytosis. *Am J Neuroradiol* 2004; 25: 880-891.

Prosch H, Grois N, Prayer D, Waldhauser F, Steiner M, Minkov M, et al. Central Diabetes Insipidus as presenting symptom of Langerhans cell histiocytosis. *Pediatr Blood Cancer* 2004; 43 (5): 594-599.

Randolph, GJ. Is Maturation Required for Langerhans Cell Migration? *J Exp Med* 2002; 196(4): 413-416.

Rasmussen OF. Controls. In: Key M, editor. *Education guide: Immunohistochemical staining methods* 4th ed. California: Dako; 2006. p. 113-118).

Réfabert L, Rambaud C, Mamou-Mani T, Scheinmann P, De Blic J. Cd1a-positive cells in bronchoalveolar lavage samples from children with Langerhans cell histiocytosis. *J Pediatr* 1996; 129(6): 913-915.

Ringdén O, Ahström L, Lönnqvist B, Bärtyd I, Svedmyr E, Gahrton G. Allogenic bone marrow transplantation in a patient with chemotherapy-resistant progressive histiocytosis X. *N Engl J Med* 1987; 316(12): 733-735.

Rodriguez-Galindo C, Kelly P, Jeng M, Presbury G, Rieman M, Wang W. Treatment of children with Langerhans cell histiocytosis with 2-chlorodeoxyadenosine. *Am J Hematol* 2002 ; 69(3): 179-184.

Sakata N, Toguchi N, Kimura M, Nakayama M, Kawa K, Takemura T. Development of Langerhans Cell Histiocytosis Associated With Chronic Active Epstein-Barr Virus Infection. *Pediatr Blood Cancer* 2007; 50(4): 924-927.

Salotti JA, Nanduri V, Pearce M, Parker L, Lynn R, Windebank KP. Incidence and clinical features of Langerhans cell histiocytosis in the UK and Ireland. *Arch Dis Child* 2009; 94(5): 376-380.

Sartoris D, Parker B. Histiocytosis X: rate and pattern of resolution of osseous lesions. *Radiology* 1984; 152(3): 679-684.

- Savasan S. An enigmatic disease: childhood Langerhans cell histiocytosis in 2005. *Int J Dermatol* 2006; 45(3): 182-188.
- Schmitz L, Favara BE. Nosology and Pathology of Langerhans Cell Histiocytosis. *Hematol Oncol Clin North Am* 199; 12(2): 221-246.
- Séguier S, Bodineau A, Godeau G, Pellat B, Brousse N. Langerin+ versus CD1+ Langerhans cells in human gingival tissue: a comparative and quantitative immunohistochemical study. *Arch Oral Biol* 2003; 48(4): 255-262.
- Sessa S, Sommelet D, Lascombes P, Prévot J. Treatment of Langerhans cell histiocytosis in children. *J Bone Joint Surg* 1994; 76(10): 1513-1525.
- Sholl LM, Hornick JL, Pinkus JL, Pinkus GS, Padera RF. Immunohistochemical Analysis of Langerin in Langerhans Cell Histiocytosis and Pulmonary Inflammatory and Infectious Diseases. *Am J Surg Pathol* 2007; 31(6): 947-952.
- Siegelman SS. Taking the X out of Histiocytosis X. *Radiology* 1997; 204(2): 322-324.
- Sieling PA, Chatterjee D, Porcelli SA, Prigozy TI, Mazzaccaro RJ, Soriano T, et al. CD1-Restricted T Cell Recognition of Microbial Lipoglycan Antigens. *Science* 1995; 269 (5221): 227-230.
- Sousa F, Etges A, Corrêa L, Mesquita R, de Araújo N. Pediatric oral lesions: a 15-year review from São Paulo, Brazil. *J ClinPediatrDent* 2002; 26(4): 413-418.
- Stalemark H, Laurencikas E, Karis J, Gavhead D, Fadeel B, Henter JI. Incidence of Langerhans Cell Histiocytosis in Children: A Population - Based Study. *Pediatr Blood Cancer* 2008; 51(1): 76-81.
- Steiner M, Matthes-Martin S, Attarbaschi A, Minkov M, Grois N, Unger E, et al. Improved outcome of treatment-resistant high-risk Langerhans cell histiocytosis after allogeneic stem cell transplantation with reduced-intensity conditioning. *Bone Marrow Transplant* 2005; 36(3): 215-225.
- Stine KC, Saylor RL, Saccente S, McClain KL, Becton DL. Efficacy of continuous infusion 2-CDA (Cladribine) in pediatric patients with Langerhans cell histiocytosis. *Pediatr Blood Cancer* 2004; 43(1): 81-84.
- Surico G, Muggeo P, Muggeo V, Conti V, Novielli C, Romano A, et al. Ear involvement in childhood langerhans' cell histiocytosis. *Head Neck* 2000; 22(1): 42-47.
- Takahama Jr A, León JE, de Almeida OP, Kowalski L P. Nonlymphoid mesenchymal tumors of the parotid gland. *Oral Oncol* 2008; 44(10): 970-974.
- Tantiwongkosi B, Goske MJ, Steele M. Congenital solid neck mass: a unique presentation of Langerhans cell histiocytosis. *Pediatr Radiol* 2008; 38(5): 575-578.
- The Clinical Writing Group of Histiocyte Society. Histiocytosis Syndromes in children. *Lancet* 1987; 2 (8549): 208-209

The Clinical Writing Group of the Histiocyte Society. Histiocytosis syndromes in children: II. Approach to the clinical and laboratory evaluation of children with Langerhans cell histiocytosis. *Med Pediatr Oncol* 1989; 17(6): 492-495.

The French Langerhan's Cell Histiocytosis Study Group. A multicentre retrospective survey of Langerhan's cell histiocytosis: 348 cases observed between 1983 and 1993. *Arch Dis Child* 1996; 75(1): 17-24.

The French LCH Study Group. Endocrine involvement in pediatric-onset Langerhans' cell histiocytosis: a population- based study. *J Pediatr* 2004; 144(3): 344-350.

The Langerhans Cell histiocytosis Salvage Therapy Working Group Histiocyte Society. (2005). LCH-S-2005: An International Phase II Study evaluating the combination of Cladribine (2 CdA) + Cytarabine Cytosine-arabioside in refractory Multisystem Langerhans Cell Histiocytosis (LCH).

Thomas R, Lipsky PE. Dendritic Cells: Origin and Differentiation. *Stem Cells* 1996; 14(2): 196-206.

Titgemeyer C, Grois N, Minkov M, Flucher-Wolfram Gatterre-Menz I, Gardner H. Pattern and course of single-system disease in Langerhans cell histiocytosis data from the DAL-HX 83- and - 90 study. *Med Pediatr Oncol* 2001; 37(2): 108-114.

Valladeau J, Duvert-Frances V, Pin J, Dezutter-Dambuyant C, Vincent C, Massacrier C, et al. The monoclonal antibody DCGM4 recognizes Langerin, a protein specific of Langerhans cells, and is rapidly internalized from the cell surface. *Eur J Immunol* 1999; 29(9): 2695-2704.

Valladeau J, Ravel O, Dezutter-Dambuyant C, Moore K, Kleijmeer M, Liu Y, et al. Langerin, a novel C-type lectin specific to Langerhans cells, is an endocytic receptor that induces the formation of Birbeck granules. *Immunity* 2000; 71-81.

Valliani L, Kanwar V, Schwartz A. Isolated Pulmonary Langerhans Cell Histiocytosis With Recurrent Bilateral Pneumothoraces Treated With Chemotherapy and Chemical Pleurodesis. *Pediatr Blood Cancer* 2009; 53(1): 128-129.

Vassallo R, Ryu JH, Colby TV, Hartman T, Limper AH. Pulmonary Langerhans cell histiocytosis. *N Engl J Med* 2000; 342(26): 1969-1978.

Viana MB, Oliveira BM, Silva CM, Leite VHR. Etoposide in treatment of six children with Langerhans Cell Histiocytosis (Histiocytosis X). *Med Pediatr Oncol* 1991; 19(4):289-294.

Weitzman S, Wayne AS, Arceci R, Lipton JM, Whitlock JA. Nucleoside analogues in the therapy of Langerhans cell histiocytosis: a survey of members of the Histiocyte Society and review of the literature. *Med Ped Oncol* 1999; 33(5): 476-481.

Willis B, Ablin A, Weinberg V, Zoger S, Wara WM, Matthay KK. Disease Course and Late Sequelae of Langerhans' Cell Histiocytosis: 25-Year Experience at the University of California, San Francisco. *J Clin Oncol* 1996; 14(7): 2073-2082.

Willman CL. Detection of clonal Histiocytes in Langerhans cell histiocytosis: biology and clinical significance. *Brit J Cancer Suppl* 1994; 23: S29-S33.

Willman CL, McClain KL. An update on clonality, cytokines, and viral etiology in langerhans cell histiocytosis. *Hematol Oncol Clin North Am* 1998; 12(2): 407-416.

Willman CL, Busque L, Griffith BB, Favara BE, McClain KL, Duncan MH, Gilliland DG. Langerhans cell histiocytosis (Histiocytosis X): a clonal proliferative disease. *N Engl J Med* 1994; 331(3): 154-160.

Wnorowski M, Prosch H, Prayer D, Janssen G, Gadner H, Grois N. Pattern and Course of Neurodegeneration in Langerhans Cell Histiocytosis. *J Ped* 2008 ; 153(1): 127-132.

Wu L, Shortman K. Heterogeneity of thymic dendritic cells. *Sem Immunol* 2005; 17(4): 304-312.

Yağci B, Varan A, Cağlar M, Söylemezoğlu F, Sungur A, Orhan D, et al. Langerhans cell histiocytosis: retrospective analysis of 217 cases in a single center. *Ped Hematol Oncol* 2008; 25(5): 399-408.

Yang WI. Immunohistochemical study of antigenic phenotype of Langerhans cell histiocytosis. *Yonsei Med J* 1992; 33(4): 309-319.

Yu RC, Chu AC, Chu C, Buluwela L. Clonal proliferation of Langerhans cells in Langerhans cell histiocytosis. *Lancet* 1994; 343 (8900): 767-768.

Zajonc DM, Elsliger MA, Teyton L, Wilson IA. Crystal structure of CD1a in complex with a sulfatide self antigen at a resolution of 2.15 Å. *Nature Immunol* 2003; 4(8): 808-815.

## **Anexos**

### **Anexo 1**

Aprovação do projeto: Câmara do Departamento de Pediatria, Serviço de Hematologia do HC-UFMG, Departamento de Anatomia Patológica e Medicina Legal da Faculdade de Medicina- UFMG, Diretoria de Ensino, Pesquisa e Extensão do HC-UFMG e Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG.

Universidade Federal de Minas Gerais  
Departamento de Pediatria – FM/UFMG

PARECER 34/2007

**Título:** Histiocitose das células de Langerhans na criança: revisão dos achados clínicos, anátomo-patológicos e imunohistoquímicos dos casos diagnosticados no Hospital das Clínicas da UFMG.

**Pesquisadores:** Professora Benigna Maria de Oliveira - orientadora  
Professor Marcos Borato Viana - orientador  
Luciana Terra Babeto - mestranda

**Instituição responsável:** UFMG.

**Data prevista para o início do projeto:** julho/2007;

**Data prevista para o término do projeto:** marco/2009.

**Documentação**

1. Carta de encaminhamento ao DPE/FM-UFMG, em 24/04/2007, solicitando avaliação do projeto, assinada pela Professora Benigna Maria de Oliveira;
2. Protocolo da Pesquisa, constando título, sumário com referências bibliográficas, descrição com justificativa, hipótese a testar, objetivos, pacientes e métodos e formulário para coleta de dados;
3. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE, de acordo com o item IV da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, para os pacientes e responsáveis pelos pacientes;
4. Termo de Compromisso dos Pesquisadores em cumprir os termos da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, com assinatura dos mesmos;
5. Curriculum Vitae do pesquisador responsável e de cada um dos demais participantes: disponíveis na plataforma e de acordo com o modelo Lattes.

**Projeto**

**Objetivos:**

- 1) Revisão dos achados anátomo-patológicos e imuno-histoquímicos de crianças acompanhadas no Ambulatório de Hematologia do HC-UFMG com diagnóstico prévio de Histiocitose das Células de Langerhans – HCL, antes de 2004;
- 2) Análise da evolução clínica da doença incluindo o grupo anterior com confirmação diagnóstica e crianças acompanhadas e diagnosticadas a partir de 2004 (histoquímica disponível) até junho/2008.

**Mérito**

Trata-se de estudo de grande relevância, pois poderá contribuir para o entendimento da doença, principalmente com relação à evolução clínica e abordagem terapêutica.

**Parecer:**

O protocolo da pesquisa contempla os aspectos fundamentais com descrição detalhada, clara e concisa do estudo. O mesmo não oferece riscos aos pacientes já que os dados serão coletados parte retrospectivamente, em prontuários e material (exames anátomo-patológicos) já coletados anteriormente e parte prospectivamente, porém toda a intervenção é parte do protocolo de acompanhamento aos pacientes.

**Voto:**

**S.M.J. somos pela aprovação do projeto.**

Belo Horizonte, 11/05/2007

Aprovado o parecer do relator  
em 11/05/07

Prof.º Celso de Almeida Coelho Neto  
Chefe do Departamento de Pediatria  
Faculdade de Medicina / UFMG



Belo Horizonte, 22 de maio de 2007.

O projeto de pesquisa intitulado: "Histiocitose das Células Langerhans na Criança: Revisão dos achados clínicos, anátomo-patológicos e imunohistoquímicos dos casos diagnosticados no Hospital das Clínicas da UFMG" da aluna Luciana Terra Babeto, do Curso de pós-graduação, nível mestrado em Saúde da Criança e do Adolescente – UFMG-MG, tendo como orientadora a Profª Benigna Maria de Oliveira e Co-Orientador o Prof. Marcos Borato Viana, foi apresentado e aprovado na Reunião do Serviço de Hematologia do dia 21/04/2007, com concordância da realização do mesmo pela Unidade Funcional Hematologia.

**Dr. Daniel Dias Ribeiro**  
Gerente da Unidade Funcional Hematologia  
Hospital das Clínicas – UFMG

**Prof Marcos Borato Viana**  
Coordenador do Serviço de Hematologia  
Hospital das Clínicas - UFMG

Belo Horizonte, 5 de junho de 2007

Ilmo Prof.  
Dr Alfredo José Afonso Barbosa  
Chefe do APM

Prezado Professor,

Recebi para emissão de parecer o projeto de dissertação de mestrado intitulado "Histiocitose das células de Langerhans na criança: revisão dos achados clínicos, anátomo-patológicos e imunohistoquímicos dos casos diagnosticados no Hospital das Clínicas da UFMG", de autoria de Benigna Maria de Oliveira (orientadora) e Luciana Terra Babeto (mestranda).

O projeto está agora sendo submetido à Câmara Departamental do Departamento de Anatomia Patológica (APM), como requisito do Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG.

Trata-se de pesquisa retrospectiva e prospectiva em doença rara na criança, já que o Serviço de Hematologia do Hospital das Clínicas da UFMG é referência para tratamento da doença. O estudo envolve uma série de 7 (sete) casos diagnosticados até o ano de 2004; a estes serão acrescentados os novos pacientes, até 2008 (estimativa de 40 casos), com diagnóstico de Histiocitose das células de Langerhans.

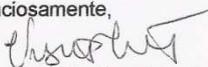
Estes casos serão avaliados quanto aos dados clínicos, anátomo-patológicos e imunohistoquímicos. O projeto tem mérito porque visa estabelecer o diagnóstico definitivo através da pesquisa do antígeno CD1a e, estudar a evolução da doença quanto a apresentação clínica e ao tratamento. Neste contexto, será útil para melhor compreensão dos mecanismos que envolvem a doença.

Quanto aos exames anátomo-patológicos e imunohistoquímicos, a Profa. Lúcia Porto Fonseca de Castro, tem conhecimento científico e experiência nesta área para nortear seu andamento.

O desenvolvimento deste projeto não depende de recursos financeiros adicionais ou utilização de pessoal técnico e material do APM, do Serviço de Anatomia Patológica ou do Hospital das Clínicas da UFMG. Os anticorpos foram adquiridos com fundos provenientes do Adicional de Bancada, associado à Bolsa de produtividade em Pesquisa/CNPq, do Prof. Marcos Borato Viana, com intermediação da FUNDEP.

**Parecer:** Diante do exposto, considero que a Câmara Departamental do APM deva aprovar o desenvolvimento do projeto acima referido, com a colaboração da Profa. Lúcia Porto Fonseca de Castro.

Atenciosamente,

  
Prof. Virgínia Hora Rios Leite

05/06/07  
  
Prof. Alfredo José Afonso Barbosa  
Inscrição: 057843  
CHEFE  
Anatomia Patológica e Medicina Legal  
UFMG



**Universidade Federal de Minas Gerais**  
**Hospital das Clínicas**  
Diretoria de Ensino, Pesquisa e Extensão - DEPE

UFMG

Belo Horizonte, 17 de julho de 2007.

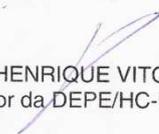
PROCESSO Nº 091/2007

**TÍTULO: "Histiocitose ds Células de Langerhans na criança: revisão dos achados clínicos, anátomo-patológicos e imunohistoquímicos dos casos diagnosticados no HC/UFMG".**

Sr(a) Pesquisador(a):

Reportando-nos ao projeto de pesquisa acima referenciado, considerando sua concordância com o parecer da Comissão de Avaliação Econômico-financeira de Projetos de Pesquisa do HC e a aprovação pelo COEP/UFMG em 27/06/2007, esta Diretoria aprova seu desenvolvimento no âmbito institucional. Solicitamos enviar à DEPE relatório parcial ou final, após um ano.

Atenciosamente,

  
PROF. HENRIQUE VITOR LEITE  
Diretor da DEPE/HC-UFMG

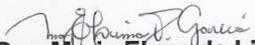
À SrA.  
Profa. Benigna Maria de Oliveira  
Depto. de Pediatria  
Faculdade de Medicina/UFMG

UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais  
Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG - COEP**Parecer nº. ETIC 271/07****Interessado(a): Profa. Benigna Maria de Oliveira**  
**Depto. Pediatria**  
**Faculdade de Medicina -UFMG****DECISÃO**

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 27 de junho de 2007, o projeto de pesquisa intitulado "**Histiocitose das Células de Langerhans na criança: Revisão dos achados clínicos, anátomo-patológicos e imunohistoquímicos dos casos diagnosticados no Hospital das Clínicas da UFMG**" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

  
**Profa. Dra. Maria Elena de Lima Perez Garcia**  
**Coordenadora do COEP-UFMG**

## Anexo 2

### **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - Para os pais ou responsáveis pelo paciente**

Você está sendo convidado a participar da pesquisa intitulada **“Histiocitose das Células de Langerhans na criança: revisão dos achados clínicos, anátomo-patológicos e imuno-histoquímicos dos casos diagnosticados no Hospital das Clínicas da UFMG”**, que será realizada no Serviço de Hematologia do Hospital das Clínicas da UFMG, sob responsabilidade da Profa. Benigna Maria de Oliveira, Profa. Lúcia Porto Fonseca e Dra. Luciana Terra Babeto.

A Histiocitose das Células de Langerhans, conhecida anteriormente como Histiocitose X, é uma doença rara que acomete principalmente crianças. Os locais mais comumente envolvidos são os ossos, pele e linfonodos (gânglios ou “ínguas”). A evolução da doença é muito variável e até hoje não se sabe a sua causa. Por isso, é muito importante que o seu diagnóstico seja feito corretamente. O diagnóstico deve ser feito por biópsia (exame de um pequeno pedaço do local acometido pela doença). Neste material é realizado um exame especial chamado imuno-histoquímica com pesquisa do anticorpo CD1a. Se esse exame for positivo, em conjunto com outros exames, o diagnóstico pode ser confirmado. No Hospital das Clínicas da UFMG esse exame passou a ser realizado a partir de 2004.

Os objetivos desta pesquisa são: realizar esse exame nas biópsias dos pacientes diagnosticados antes de 2004 para obter a confirmação do diagnóstico, estudar a evolução de todos os pacientes com diagnóstico de Histiocitose das Células de Langerhans tratados no Serviço de Hematologia e avaliar os resultados obtidos com o tratamento. Nos casos em que o diagnóstico foi feito antes de 2004, será feita uma revisão do material da biópsia com a realização da imuno-histoquímica com pesquisa do CD1a (explicado acima). Não será necessária a realização de nova biópsia para as finalidades da pesquisa. Será utilizado o material colhido na ocasião do diagnóstico e armazenado no Serviço de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas da UFMG.

Ao concordar com a participação na pesquisa, você estará autorizando a revisão no material da biópsia (como explicado acima) e que os pesquisadores consultem os dados clínicos e laboratoriais de seu filho ou da criança pela qual você é responsável.

O tratamento de seu filho não será modificado. O médico responsável pelo tratamento de seu filho será informado a respeito dos resultados obtidos com a revisão da biópsia. Todas as

avaliações e publicações científicas serão feitas respeitando-se o segredo profissional e a proteção dos dados pessoais. Portanto, os participantes não serão identificados.

Você poderá se recusar a participar ou retirar seu consentimento, em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao cuidado de seu filho. Você não receberá remuneração por participar do estudo. Nós responderemos a qualquer questão relativa ao estudo, agora ou em qualquer momento que for necessário. Os telefones de contato do Serviço de Hematologia são os seguintes: 3409-9397 e 3409-9207. Você também poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (Avenida Antônio Carlos, 6627, Unidade Administrativa II, 2º andar, sala 2005. Telefone 3499-4592).

### CONSENTIMENTO PÓS-INFORMADO

Eu, \_\_\_\_\_ abaixo assinado, declaro que após ter sido convenientemente esclarecido sobre a pesquisa **“Histiocitose das Células de Langerhans na criança: revisão dos achados clínicos, anátomo-patológicos e imuno-histoquímicos dos casos diagnosticados no Hospital das Clínicas da UFMG”**, consinto em participar na qualidade de responsável pelo paciente \_\_\_\_\_, até que eu decida em contrário.

Belo Horizonte, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 200\_\_

Responsável.....

Pesquisador.....

Paciente (com idade de 7 anos a 12 anos) -----

### Anexo 3

#### **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - Dirigido aos pacientes**

Você está sendo convidado a participar da pesquisa intitulada **“Histiocitose das Células de Langerhans na criança: revisão dos achados clínicos, anátomo-patológicos e imuno-histoquímicos dos casos diagnosticados no Hospital das Clínicas da UFMG”**, que será realizada no Serviço de Hematologia do Hospital das Clínicas da UFMG, sob responsabilidade da Profa. Benigna Maria de Oliveira, Profa. Lúcia Porto Fonseca e Dra. Luciana Terra Babeto.

A Histiocitose das Células de Langerhans, conhecida anteriormente como Histiocitose X, é uma doença rara que acomete principalmente crianças. Os locais mais comumente envolvidos são os ossos, pele e linfonodos (gânglios ou “ínguas”). A evolução da doença é muito variável e até hoje não se sabe a sua causa. Por isso, é muito importante que o seu diagnóstico seja feito corretamente. O diagnóstico deve ser feito por biópsia (exame de um pequeno pedaço do local acometido pela doença). Neste material é realizado um exame especial chamado imuno-histoquímica com pesquisa do anticorpo CD1a. Se esse exame for positivo, em conjunto com outros exames, o diagnóstico pode ser confirmado. No Hospital das Clínicas da UFMG esse exame passou a ser realizado a partir de 2004.

Os objetivos desta pesquisa são: realizar esse exame nas biópsias dos pacientes diagnosticados antes de 2004 para obter a confirmação do diagnóstico, estudar a evolução de todos os pacientes com diagnóstico de Histiocitose das Células de Langerhans tratados no Serviço de Hematologia e avaliar os resultados obtidos com o tratamento. Nos casos em que o diagnóstico foi feito antes de 2004, será feita uma revisão do material da biópsia com a realização da imuno-histoquímica com pesquisa do CD1a (explicado acima). Não será necessária a realização de nova biópsia para as finalidades da pesquisa. Será utilizado o material colhido na ocasião do diagnóstico e armazenado no Serviço de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas da UFMG.

Ao concordar com a participação na pesquisa, você estará autorizando a revisão no material da biópsia (como explicado acima) e que os pesquisadores consultem os seus dados clínicos e laboratoriais (exames)

O seu tratamento não será modificado. O médico responsável pelo seu tratamento será informado a respeito dos resultados obtidos com a revisão da biópsia. Todas as avaliações e

publicações científicas serão feitas respeitando-se o segredo profissional e a proteção dos dados pessoais. Portanto, os participantes não serão identificados.

Você poderá se recusar a participar ou retirar seu consentimento, em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado. Você não receberá remuneração por participar do estudo. Nós responderemos a qualquer questão relativa ao estudo, agora ou em qualquer momento que for necessário. Os telefones de contato do Serviço de Hematologia são os seguintes: 3409-9397 e 3409-9207. Você também poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (Avenida Antônio Carlos, 6627, Unidade Administrativa II, 2º andar, sala 2005. Telefone 3499-4592).

#### CONSENTIMENTO PÓS-INFORMADO

Eu, \_\_\_\_\_ abaixo assinado, declaro que após ter sido convenientemente esclarecido sobre a pesquisa **“Histiocitose das Células de Langerhans na criança: revisão dos achados clínicos, anátomo-patológicos e imuno-histoquímicos dos casos diagnosticados no Hospital das Clínicas da UFMG”**, consinto em participar na qualidade de paciente \_\_\_\_\_, até que eu decida em contrário.

Belo Horizonte, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 200\_\_

Responsável.....

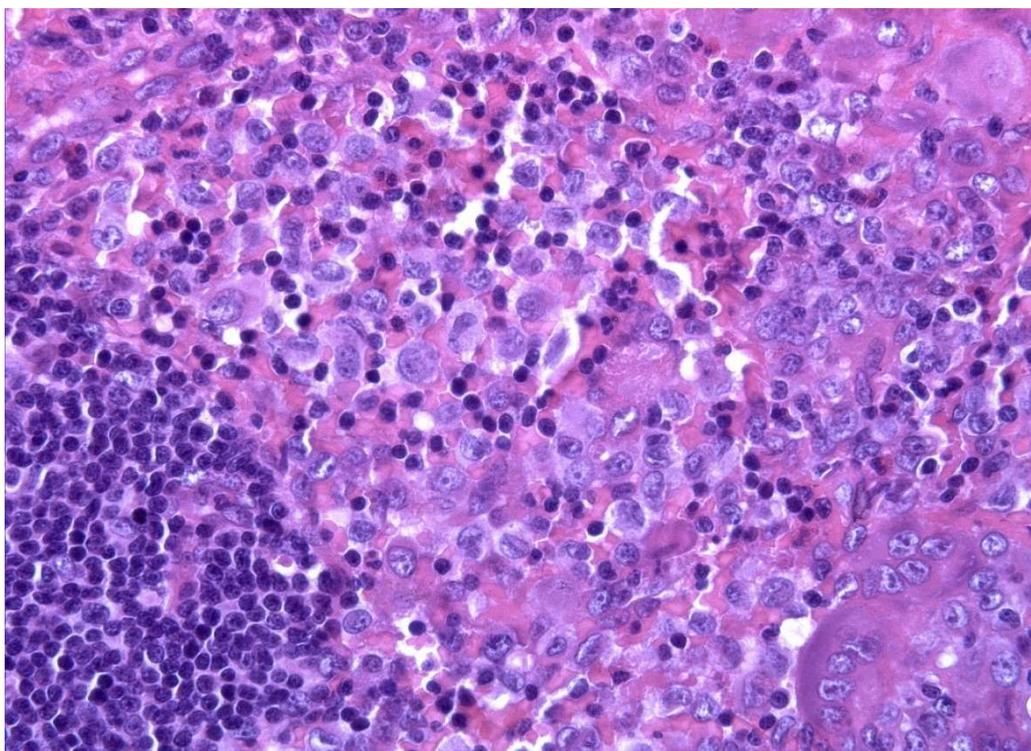
Pesquisador.....

Paciente (com idade  $\geq$  13 anos) -----

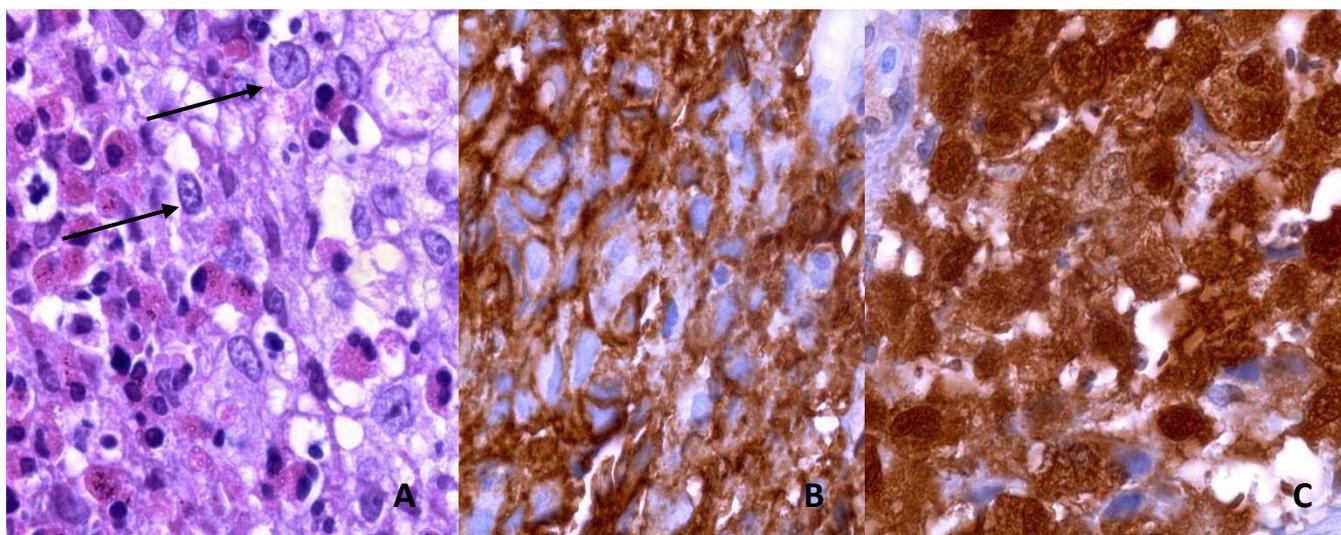
#### Anexo 4

Fotos de exames anátomo-patológicos, imuno-histoquímicos e de microscopia eletrônica.

**Figura 16**



Linfonodo com infiltração por células de Langerhans, em meio a diversos eosinófilos e linfócitos, além de algumas células gigantes multinucleadas (HE, 400X).

**Figura 17**

Cortes de mucosa oral, com aumento de 1000x. **Figura A:** Infiltração por grande número de células de Langerhans (setas), com presença de diversos eosinófilos e alguns linfócitos. (HE). **Figura B:** Imuno-histoquímica evidenciando marcação do citoplasma das células de Langerhans para anticorpo anti-CD1a. **Figura C:** marcação do citoplasma das células de Langerhans para anticorpo anti- proteína S100 (na mesma lesão).

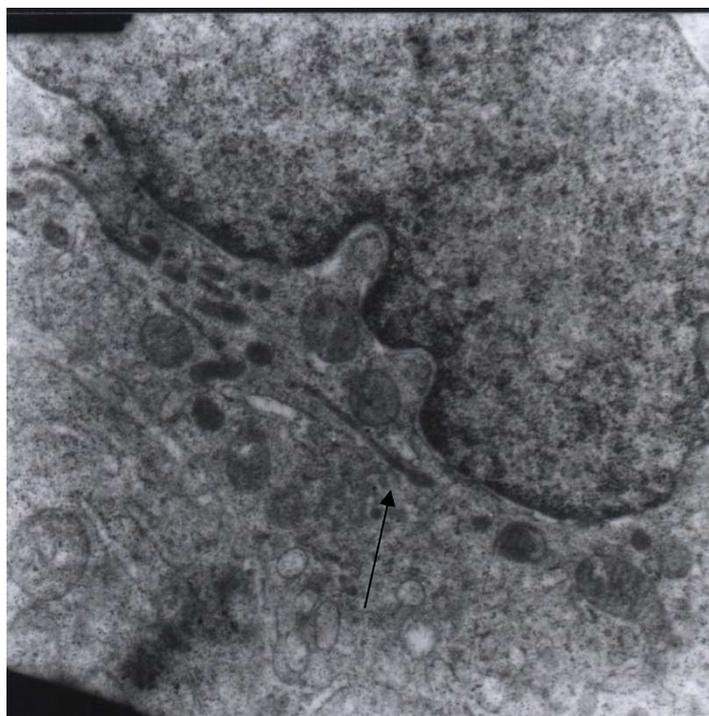
**Figura 18**

Foto de microscopia eletrônica mostrando célula de Langerhans com presença de grânulos de Birbeck .