

# Granuloma Anular: distribuição tecidual dos dendrócitos dérmicos fator XIIIa<sup>+</sup>, das células dérmicas trombomodulina<sup>+</sup> e de macrófagos CD68<sup>+</sup>\*

## *Granuloma Annulare: tissue distribution of factor XIIIa<sup>+</sup> dermal dendrocytes, thrombomodulin<sup>+</sup> dermal cells and CD68<sup>+</sup> macrophages*\*

Claudia Regina Wanderley Soub<sup>1</sup>Mayra Carrijo Rochael<sup>2</sup>Tullia Cuzzi<sup>3</sup>

**Resumo:** FUNDAMENTOS - Um subgrupo de células dérmicas relacionado a macrófagos expressa o fator pró-coagulante XIIIa enquanto outro subgrupo expressa o co-fator anticoagulante trombomodulina. Esses tipos celulares podem estar envolvidos em eventos de inflamação e reparo tecidual.

**OBJETIVOS** - Investigar a participação de células dérmicas fator XIIIa<sup>+</sup> e de células dérmicas trombomodulina<sup>+</sup> (TM) no quadro histopatológico do granuloma anular que se caracteriza por necrobiose do colágeno e presença de infiltrado de macrófagos.

**MATERIAIS E MÉTODOS** - O quadro histopatológico do granuloma anular observado em 23 fragmentos da pele obtida pela biópsia foi classificado de acordo com a presença de degeneração completa ou incompleta do colágeno e distribuição do infiltrado inflamatório. Dendrócitos dérmicos fator XIIIa<sup>+</sup> e células dérmicas trombomodulina<sup>+</sup> foram reconhecidos por meio de anticorpos próprios aplicados em protocolos de imuno-histoquímica; um marcador para macrófagos (CD68) também foi utilizado. Observou-se a distribuição dos subtipos celulares distintos, bem como realizou-se análise semiquantitativa.

**RESULTADOS** - Dendrócitos fator XIIIa<sup>+</sup> foram escassamente detectados, enquanto células trombomodulina<sup>+</sup> e CD68<sup>+</sup> representaram considerável proporção do infiltrado celular, observadas na posição periférica (arranjo em paliçada), entre fibras colágenas degeneradas ou mesmo difusamente distribuídas. Houve tendência de associação da semiquantificação alta de células trombomodulina<sup>+</sup> com a semiquantificação baixa de dendrócitos fator XIIIa<sup>+</sup> e com o tipo histológico II. Hiperplasia de dendrócitos dérmicos ao redor da lesão foi observada.

**CONCLUSÃO** - A diferente distribuição tecidual de células fator XIIIa<sup>+</sup> e TM<sup>+</sup> pode refletir suas participações distintas e complementares no reparo do tecido dérmico e no processo evolutivo da lesão no granuloma anular.

**Palavras-chave:** fator XIIIa; granuloma anular; trombomodulina.

**Summary:** BACKGROUND - A subgroup of macrophage related dermal cells expresses the pro-coagulation factor XIIIa, while others express the anti-coagulation cofactor thrombomodulin. These cells can be involved in inflammatory and reparative tissue events.

**OBJECTIVES** - We investigated the participation of factor XIIIa<sup>+</sup> dermal cells and thrombomodulin<sup>+</sup> (TM<sup>+</sup>) dermal cells in the histopathological picture of granuloma annulare which is characterized by collagen necrobiosis and macrophagic infiltrate.

**METHODS** - The histopathological picture of granuloma annulare observed in 23 skin biopsies was classified according to presence of complete or incomplete collagen degeneration and distribution of dermal infiltrate. Factor XIIIa<sup>+</sup> dermal dendrocytes and thrombomodulin<sup>+</sup> dermal cells were recognized by specific antibodies applied in immunohistochemical protocols; a macrophage marker (CD68) was also used. Distribution of distinct cell subsets were observed and semiquantitative analysis performed.

**RESULTS** - Factor XIIIa<sup>+</sup> dendrocytes were rarely detected in the lesion while thrombomodulin<sup>+</sup> and CD68<sup>+</sup> cells represented a considerable part of cell infiltrate. They were seen at its periphery (palisade arrangement), among degenerated collagen or diffusely distributed. A tendency was noted for association between higher semiquantification of thrombomodulin<sup>+</sup> cells and both lower semiquantification of FXIIIa<sup>+</sup> dendrocytes and histological type II. Dermal dendrocyte hyperplasia around the lesion was detected.

**CONCLUSION** - The different tissue distribution of the FXIIIa<sup>+</sup> cells and TM<sup>+</sup> cells could reflect their distinct and complementary roles in the recovery of dermal tissue and in the lesion evolutive process in granuloma annulare.

**Key words:** factor XIIIa; granuloma annulare; thrombomodulin.

Recebido em 09.11.2001. / Received in November, 09<sup>th</sup> of 2001.

Aprovado pelo Conselho Consultivo e aceito para publicação em 05.12.2002. / Approved by the Consultive Council and accepted for publication in December, 05<sup>th</sup> of 2002.

\* Trabalho realizado no Serviço de Anatomia Patológica do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas/Fundação Oswaldo Cruz - RJ. / Work done at Pathological Anatomy Service of "Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz - RJ".

<sup>1</sup> Mestre em Dermatologia, Departamento de Dermatologia da Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro, Brasil. / Masters degree in Dermatology, Dermatology Department of "Universidade Federal Fluminense", Rio de Janeiro, Brazil.

<sup>2</sup> Professora Adjunta do Departamento de Patologia da Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro, Brasil. / Adjunct Professor, Pathology Department of "Universidade Federal Fluminense", Rio de Janeiro, Brazil.

<sup>3</sup> Pesquisadora Associada do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro; Professora Adjunta do Departamento de Patologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil. / Researcher Associated to "Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz", Rio de Janeiro; Adjunct Professor, Pathology Department of "Universidade Federal do Rio de Janeiro", Rio de Janeiro, Brazil.

## INTRODUÇÃO

O granuloma anular constitui um distúrbio inflamatório da pele de etiologia desconhecida, caracterizado por um número variado de pápulas não pruríticas que frequentemente coalescem de forma anular. O quadro histológico é caracterizado pela presença de necrobiose completa ou incompleta do colágeno associada a um infiltrado inflamatório particularmente representado por macrófagos que se colocam entre e ao redor de fibras colágenas degeneradas.

Os eventos fisiopatológicos que levam à formação do granuloma necrobiótico são desconhecidos.<sup>1</sup> Existem diversas teorias quanto aos processos semelhantes à vasculite mediados por imunocomplexos,<sup>1,2</sup> reação de hipersensibilidade a um antígeno desconhecido<sup>3</sup> e nível funcional de neutrófilos e monócitos.<sup>4,5</sup> Em 1994, Ahmed *et al.*<sup>6</sup> relataram um estudo sobre biópsias de lesões granulomatosas, sugerindo a participação ativa da interleucina (IL-6) e do fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) na continuação dos granulomas.

Foi reconhecido que a derme humana normal apresenta diversos subconjuntos de células que se distinguem por seu imunofenótipo e que são histogeneticamente relacionadas aos macrófagos. Um subgrupo dessas células é chamado de dendrócitos dérmicos e expressa o fator de pró-coagulação XIIIa (FXIIIa).<sup>7,8</sup> Essas células apresentam morfologia dendrítica, são localizadas na derme papilar e ao redor dos vasos<sup>8</sup> e têm participação na apresentação antigênica,<sup>7,8</sup> na fagocitose,<sup>7</sup> na regulação da síntese de colágeno<sup>9</sup> e na hemostasia dérmica.<sup>10</sup> Por outro lado, as células dérmicas que expressam o co-fator anticoagulação trombomodulina (TM) foram descritas na pele humana normal e psoriática.<sup>11</sup> Na pele normal, as células dérmicas TM<sup>+</sup> estão presentes em pequena quantidade e localizadas principalmente ao redor dos vasos;<sup>11</sup> o co-fator também é detectado em células endoteliais, nas quais o antígeno foi inicialmente descrito,<sup>12,13</sup> e nos queratinócitos suprabasais. O papel funcional da molécula de TM na pele ainda não foi totalmente estabelecido; entretanto, é sabido que as vias de coagulação e anticoagulação estão relacionadas com os eventos inflamatórios.

Este estudo teve por objetivo avaliar a participação de três subtipos diferentes de células dérmicas no infiltrado celular que compõe o quadro histopatológico do granuloma anular. Seu foco principal concentrou-se nas células caracterizadas pela expressão de um fator pró-coagulação (células FXIIIa<sup>+</sup>) e nas células caracterizadas pela expressão de uma molécula anticoagulante (células TM<sup>+</sup>). Um marcador para macrófagos, o anticorpo CD68, também foi aplicado nas amostras histológicas.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Biópsias - Vinte e três biópsias de pele com diagnóstico histológico de granuloma anular foram estudadas. As amostras, obtidas do Departamento de Patologia da Universidade Federal Fluminense, foram fixadas em formalina a 10%, embebidas em parafina e processadas pelos métodos histológicos de rotina. A classificação histológica sugerida por Sánchez, Barea & Contreras<sup>14</sup> foi aplicada de modo que três casos (13%) corresponderam ao tipo I (degeneração colá-

## INTRODUCTION

*Granuloma annulare is an inflammatory skin disease of unknown etiology, characterized by a variable number of nonpruritic papules that frequently coalesce in an annular form. Histological picture is characterized by the presence of complete or incomplete collagen necrobiosis associated to an inflammatory infiltrate particularly represented by macrophages that lie between or around degenerated collagen fibers.*

*The physiopathologic events that lead to the formation of necrobiotic granuloma are unknown.<sup>1</sup> There are several theories on vasculitis type processes mediated by immunocomplexes,<sup>1,2</sup> on hypersensitivity reaction to an unknown antigen<sup>3</sup> and on the functional level of neutrophils and monocytes.<sup>4,5</sup> In 1994, Ahmed et al.<sup>6</sup> reported a study on granulomatous lesions biopsies, suggesting the active participation of interleukin (IL-6) and tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) triggering continuation of the granulomas.*

*It has been recognized that normal human dermis is populated by different subsets of cells that are distinguished by their immunophenotype and are histogenetically related to macrophages. A subgroup of these cells is denominated dermal dendrocyte and expresses the pro-coagulation factor XIIIa (FXIIIa).<sup>7,8</sup> These cells have a dendritic morphology, are located in the papillary dermis and around the vessels,<sup>8</sup> and play a role in antigen presentation,<sup>7,8</sup> in phagocytosis,<sup>7</sup> in the regulation of the collagen synthesis<sup>9</sup> and in dermal hemostasis.<sup>10</sup> On the other hand, dermal cells that express the anti-coagulation cofactor thrombomodulin (TM) were described in the normal and psoriatic human skin.<sup>11</sup>*

*In the normal skin, TM<sup>+</sup> dermal cells are present in a small amount and are located mainly around vessels;<sup>11</sup> it is also detected on endothelial cells, where the antigen was initially described<sup>12,13</sup> and in the suprabasal keratinocytes. The functional role of the TM molecule in the skin has not been completely established, however it is known that coagulation and anticoagulation pathways are related to inflammatory events.*

*This study was designed to evaluate the participation of three different subtypes of dermal cells in the cellular infiltrate that forms the histopathological picture of granuloma annulare. We particularly focused on the cells characterized by the expression of a pro-coagulant factor (FXIIIa<sup>+</sup> cells) and on cells characterized by the expression of an anticoagulant molecule (TM<sup>+</sup> cells). A pan-macrophage marker, the CD68 antibody, was also applied on histological samples.*

## MATERIAL AND METHODS

*Biopsies - Twenty-three skin biopsies with histologic diagnosis of granuloma annulare were studied. The specimens, obtained from the Department of Pathology / Fluminense Federal University, were fixed in 10% formalin, embedded in paraffin and processed by routine histological methods. The histological classification suggested by Sánchez, Barea & Contreras<sup>14</sup> was applied such that three cases (13.0%) matched type I (complete collagen degenera-*

gena completa em amplo foco central circundado por macrófagos e outras células periféricas em paliçada); 14 casos (60,9%) corresponderam ao tipo II (pequenos focos de degeneração colágena incompleta associados a um infiltrado intersticial de macrófagos); e seis casos (26,1%) foram classificados como tipo III (características histológicas mistas).

Anticorpos primários - Anticorpos contra FXIIIa (Calbiochem Novabiochem Co, 1/200 v/v dilution), TM (DAKO, 1/50 v/v dilution) e CD68 (DAKO, 1/50 v/v dilution) foram utilizados, e todos eles reagiram com os cortes histológicos a 4°C overnight.

Coloração imuno-histoquímica - Os cortes de tecido (4mm de espessura) foram montados em lâminas histológicas de vidro cobertas com silano, desparafinizados em xilol e rehidratados por soluções graduadas de etanol. Para a coloração do anticorpo CD68, os cortes de tecido foram tratados em um forno de microondas (720W) por cinco minutos, e as lâminas de vidro foram cobertas com solução tampão de citrato - pH 6. Para as reações de anticorpos anti-TM e CD68, a peroxidase endógena foi bloqueada com uma solução de peróxido de hidrogênio/metanol a 1% previamente à inibição das ligações inespecíficas de imunoglobulinas com o uso de soro normal ou albumina bovina, respectivamente. Após a incubação com os anticorpos primários, os cortes foram submetidos à reação com anticorpo anticamundongo biotilado de cavalo e com o complexo avidina-biotina-peroxidase, por 30 minutos cada (Vector Laboratory). Ainda em relação a esses dois anticorpos, a atividade peroxidase foi revelada por diaminobenzidina (Sigma Chemical Co). Para a coloração com anticorpo anti-FXIIIa, os cortes foram incubados a 37°C por 10 minutos em solução de tripsina (Sigma Chemical Co). Após inibição com soro normal de cabra por 40 minutos, os cortes foram sobrepostos com o anticorpo primário e subsequentemente com anticorpo biotilado de cabra anti-coelho e com conjugado avidina-biotina-fosfatase alcalina, 40 minutos cada (Vector Laboratory). A atividade enzimática foi revelada por corante vermelho fast red TR/naftol (Sigma). Foram executadas diluições de soro normal, anticorpos biotilados e complexos avidina-biotina-peroxidase ou fosfatase alcalina de acordo com as instruções do fabricante. Foi utilizada uma solução salina tamponada em fosfato (20mM, pH 7,0) para diluir os anticorpos anti-TM e anti-FXIIIa e para lavar os cortes sempre que necessário. O anticorpo CD68 foi diluído em albumina bovina a 1%. Todas as etapas foram executadas em temperatura ambiente, salvo como acima especificado. Os cortes histológicos foram submetidos à contracoloração com hematoxilina de Mayer.

Um controle interno positivo para as reações foi fornecido pela coloração positiva detectada em células dérmicas, adjacentes à área lesional. Também foi observada a reação positiva para a coloração de TM, na epiderme e nas células endoteliais.

Análise das células para FXIIIa<sup>+</sup>, TM<sup>+</sup> e CD68<sup>+</sup> - Uma análise semiquantitativa dos três subconjuntos distintos de células dérmicas na lesão foi executada e classificada como (-) ausência de células positivas; (+) presença de poucas células positivas (uma a três células) vistas principalmente com a

tion in wide central focus surrounded by macrophages and other peripheral palisade cells); 14 cases (60.9%) matched type II (small spots of incomplete collagen degeneration associated with an interstitial infiltrate of macrophages); and six cases (26.1%) were classified as type III (mixed histologic characteristics).

Primary antibodies - Antibodies to FXIIIa (Calbiochem Novabiochem Co, 1/200 v/v dilution), TM (DAKO, 1/50 v/v dilution) and CD68 (DAKO, 1/50 v/v dilution) were used and all reacted with the histologic sections overnight at 4°C.

Immunohistochemical staining - Tissue sections (4mm thick) were displayed on histological glass slides covered with silane, dewaxed in xylene and rehydrated through graded ethanol solutions. For the CD68 antibody staining, tissue sections were treated in a microwave oven (720W) for five minutes and the glass slides were covered with citrate buffer solution-pH 6. For the anti-TM and CD68 antibody reactions, endogenous peroxidase was blocked using a 1% hydrogen peroxide/methanol solution before the blocking of non-specific immunoglobulin binding through the use of normal serum or bovine albumin, respectively. After incubation with primary antibodies, sections reacted with biotinylated horse anti-mouse antibody and with avidin-biotin-peroxidase conjugate, 30 min each (Vector Laboratory). Still concerning these two antibodies, peroxidase activity was revealed by diaminobenzidine (Sigma Chemical Co). For staining with anti-FXIIIa antibody, the sections were incubated at 37°C for 10 min in trypsin solution (Sigma Chemical Co). After blocking with normal goat serum for 40 min, sections were overlaid with the primary antibody, and subsequently with biotinylated goat anti-rabbit antibody and with avidin-biotin-alkaline phosphatase conjugate, 40 min each (Vector Laboratory). Enzyme activity was revealed by fast red TR/naphthol (Sigma). Dilutions of normal serum, biotinylated antibodies and avidin-biotin-peroxidase or alkaline phosphate conjugates were performed following manufacturer's instructions. Phosphate buffered saline solution (20mM, pH 7.0) was used to dilute anti-TM and anti-FXIIIa antibodies and to wash sections whenever necessary. The CD68 antibody was diluted in 1% bovine albumin. All steps were performed at room temperature, unless specified above. Histological sections were counterstained with Mayer's hematoxylin.

An internal positive control for the reactions was provided by the positive staining detected on dermal cells, located adjacent to the lesional area. For the TM staining, positive reaction was also seen in the epidermis and on endothelial cells.

FXIIIa<sup>+</sup>, TM<sup>+</sup> and CD68<sup>+</sup> cells analysis - A semiquantitative analysis of the three distinct subsets of dermal cells at the lesion site was performed and classified as: (-) absence of positive cells; (+) presence of few positive cells (1 to 3 cells) mostly seen with the medium or high dry

objetiva de alta ou média resolução; (++) células positivas presentes em focos no infiltrado inflamatório, compreendendo até 20% do infiltrado celular; (+++) diversas células positivas (até 50%) presentes no infiltrado inflamatório; e (+++++) numerosas células positivas, representando a maior parte do infiltrado celular (mais de 50% das células). A hiperplasia de células FXIIIa<sup>+</sup> ao redor da lesão em comparação com o número observado na derme distante não comprometida foi relatada como (P) presente ou (A) ausente.

A análise dos resultados foi executada por todas as autoras, sem que houvesse desacordo sobre a questão.

Análise estatística - A fim de comparar os resultados da análise semiquantitativa para células TM<sup>+</sup>, células FXIIIa<sup>+</sup> e resultados (P) ou (A) (comparação de proporções), foi utilizada a análise da distribuição normal bilateral com correção de continuidade.

O teste exato de Fischer foi utilizado para avaliar a associação dos resultados semiquantitativos das células TM<sup>+</sup> com os resultados semiquantitativos das células FXIIIa<sup>+</sup>; a associação desses com os tipos histológicos; e também a associação das células FXIIIa<sup>+</sup> com o resultado (P).

O nível de significância foi estabelecido em 5%, ou seja, foi considerada a significância estatística quando  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

Dentrócitos dérmicos fator XIIIa<sup>+</sup> foram raramente detectados entre as células inflamatórias presentes na área de lesão na maioria dos casos estudados. A análise semiquantitativa relacionada a essas células foi interpretada como (-) ou (+) em 86,4% dos casos e como (++) ou (+++) nos demais ( $p < 0,001$ ). Nenhum caso foi classificado como (++++), e não foram observadas células positivas em 15 casos (68,2%). Um caso foi considerado impróprio para avaliação, uma vez que a lesão não era representada após cortes sucessivos.

Células dérmicas trombomodulina<sup>+</sup> foram detectadas em todas as amostras estudadas e representaram uma parte considerável do infiltrado celular no ponto da lesão. A análise semiquantitativa relacionada a essas células foi interpretada como (+++) ou (+++++) em 73,9% dos casos e como (+) ou (++) nos restantes ( $p = 0,018$ ). Nenhum caso foi considerado (-). Essas células foram vistas principalmente na periferia da lesão de granuloma anular (Figura 1 A e B). Algumas foram observadas isoladas entre fibras colágenas degeneradas, em especial nos casos em que elas não eram numerosas.

Os macrófagos CD68<sup>+</sup> eram numerosos, foram detectados em todas as amostras estudadas e representaram a maior parte do infiltrado celular no ponto da lesão. A análise semiquantitativa relacionada a essas células foi interpretada como (+++++) em todos os 19 casos estudados. As células encontravam-se difusamente distribuídas por toda a lesão ou dispostas em paliçada (Figura 2 A e B). Células gigantes multinucleadas positivas também foram observadas. Quatro amostras foram consideradas impróprias por não representar a lesão histologicamente após cortes sucessivos.

power objective; (++) positive cells focally present in the inflammatory infiltrate, comprising up to 20% of the cellular infiltrate; (+++) numerous positive cells (up to 50%) present in the inflammatory infiltrate; and (+++++) numerous positive cells representing most of the cellular infiltrate (more than 50% of the cells). Hyperplasia of FXIIIa<sup>+</sup> cells around the lesion as compared to their number in the uninvolved distant dermis was reported as (P) present or (A) absent.

Analysis of results were performed by all authors, without disagreement over results.

Statistic analysis: To compare the semiquantitative analysis results for TM<sup>+</sup> cells, FXIIIa<sup>+</sup> cells and (P) or (A) results (comparison of proportions) the bilateral normal distribution analysis with continuity correction was used.

Fisher's exact test was used to evaluate the association of the semi-quantitative results of the TM<sup>+</sup> cells with the semi-quantitative results of the FXIIIa<sup>+</sup> cells; the association of these with the histologic types; and also the association of FXIIIa<sup>+</sup> cells with the presence of the (P) result.

The significance level was set at 5%, i.e., statistical significance was considered when  $p < 0.05$ .

## RESULTS

Factor XIIIa<sup>+</sup> dermal dendrocytes were rarely detected among inflammatory cells in the lesional area in most cases studied. The semiquantitative analysis regarding these cells was interpreted as corresponding to (-) or (+) in 86.4% of the cases and as (++) or (+++) in the remaining ones ( $p < 0.001$ ). No case was classified as (+++++) while positive cells were not seen in 15 cases (68.2%). One case was considered improper for evaluation, since the lesion was not represented after successive sections.

Thrombomodulin<sup>+</sup> dermal cells were detected in all studied samples and represented a considerable part of the cell infiltrate at the lesion site. The semiquantitative analysis regarding these cells was interpreted as corresponding to (+++) or (+++++) in 73.9% of the cases and to (+) or (++) in the remainder ( $p = 0.018$ ). No case was considered (-). These cells were mainly seen at the periphery of the granuloma annulare lesion (Figure 1 A and B). Some were found isolated among degenerated collagen fibers, specially in those cases in which they were not numerous.

CD68<sup>+</sup> macrophages were numerous, detected in all studied samples and represented most of the cellular infiltrate at the lesion site. The semiquantitative analysis regarding these cells was interpreted as corresponding to (+++++) in all 19 cases studied. Cells were diffusely distributed throughout the lesion or displayed a palisade arrangement (Figure 2 A and B). Positive multinuclear giant cells were also seen. Four samples were considered improper for not representing the lesion histologically after successive sections.

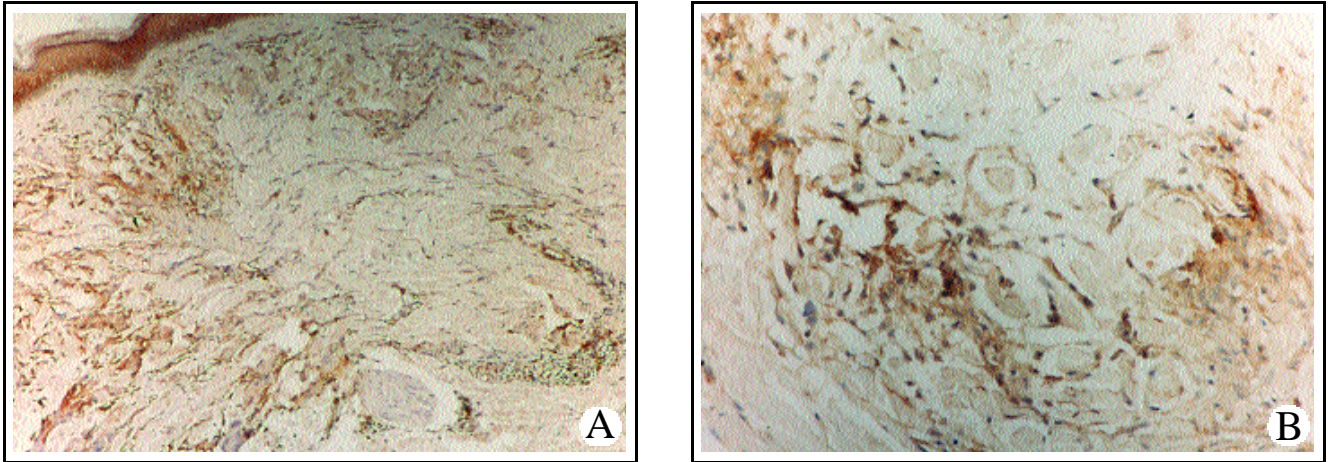


Figura 1 A e B: Células TM<sup>+</sup> na periferia da lesão de granuloma anular: uma visão panorâmica (A) e detalhe de sua disposição (B) em duas amostras diferentes (A- obj X10; B- obj X 25). / *Figure 1 A and B: TM<sup>+</sup> cells at the periphery of granuloma annulare lesion: a low power view (A) and detail of their arrangement (B) in two different samples. (A- obj X10; B- obj X 25).*

A uniformidade da semiquantificação de células CD68<sup>+</sup> (++++ para todas as amostras) não permitiram uma análise estatística relacionada à associação desses resultados com aqueles obtidos para os demais anticorpos e com a classificação histológica (tipos I, II ou III) aplicada às amostras. A análise estatística da associação dos resultados em relação à semiquantificação de células TM<sup>+</sup> e FXIIIa<sup>+</sup> considerou os grupos de casos TM (+ e ++) versus (+++ e +++) e os grupos de casos FXIIIa (- e +) versus (++) e (++++) (Tabela 1). Houve uma tendência de associação entre a semiquantificação mais alta de células TM<sup>+</sup> (casos +++ e +++) e a semiquantificação mais baixa de células FXIIIa<sup>+</sup> (casos - e +), mas nenhuma associação significativa foi observada entre esses dois marcadores ( $p = 0,17$ ). Para a análise estatística da associação dos resultados relacionados aos tipos histológicos de granuloma anular e semiquantificação de células TM<sup>+</sup>, mais uma vez foram considerados os grupos de casos TM (+ e ++) versus (+++ e +++) (Tabela 2). Nenhuma associação estatisticamente significativa

*The uniformity of the semiquantification of CD68<sup>+</sup> cells (++++ for all samples) did not enable a statistical analysis regarding the association of these results with those obtained for the other two antibodies, and with the histological classification (types I, II or III) applied on samples. Statistical analysis of the association of results regarding the semiquantification of TM<sup>+</sup> and FXIIIa<sup>+</sup> cells, considered the grouping (+ and ++) versus (+++ and +++) TM cases, and the grouping (- and +) versus (++) and (++++) FXIIIa cases (Table 1). There was a tendency of association between the higher semiquantification of TM<sup>+</sup> cells (+++ and +++) cases) and the lower semiquantification of FXIIIa<sup>+</sup> cells (- and + cases), but no significant association was found between these two markers ( $p = 0.17$ ). For statistical analysis of the association of results regarding the granuloma annulare histological types and semiquantification of TM<sup>+</sup> cells, again considered the grouping (+ and ++) versus (+++ and +++) TM cases (Table 2). No statisti-*

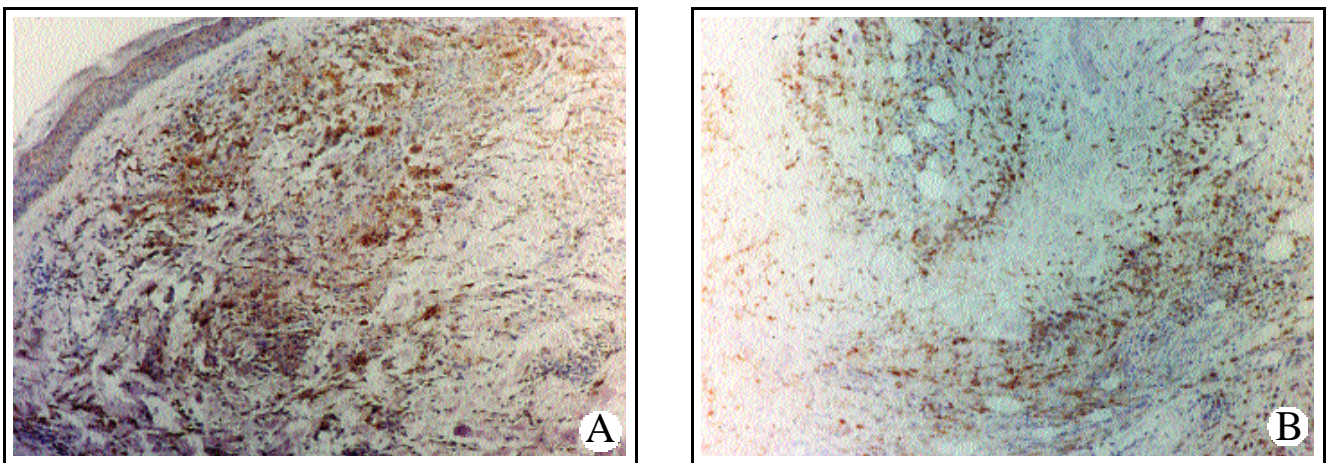


Figura 2 A e B: Macrófagos CD68<sup>+</sup> distribuídos difusamente por toda a lesão (A) e em uma disposição de paliçada (2B) (A and B- obj X10). / *Figure 2 A and B: CD68<sup>+</sup> macrophages diffusely distributed throughout the lesion (A) and in a palisade arrangement (2B). (A and B- obj X10).*

Tabela 1: Associação dos resultados relativos à semiquantificação de células TM+ e FXIIIa+, de acordo com os grupos especificados / *Table 1: Association of results regarding semi-quantification of TM+ and FXIIIa+ cells, according to the specified groups.*

Frequência / <i>Frequency</i>	(- e/and +) FXIIIa	(++ e/ and +++) FXIIIa	Total
Por linha / <i>Line per</i>			
Por coluna / <i>Column per</i>			
(+ e/ and ++) TM	4 66.67 21.05	2 33.33 66.67	6
(+++ e/ and +++) TM	15 93.75 78.95	1 6.25 33.33	16
Total	19	3	22

Por linha: porcentagem da linha / *Line per: line percentage*

Por coluna: porcentagem da coluna / *Column per: column percentage*

TM: trombomodulina / *TM: thrombomodulin*

FXIIIa: fator XIIIa / *FXIIIa: factor XIIIa*

foi observada entre os diversos tipos histológicos (II e III) e a quantidade de células TM<sup>+</sup> ( $p = 0,13$ ), apesar de haver uma tendência de associação entre o tipo histológico II e a semiquantificação mais alta de células TM<sup>+</sup> (casos +++ e ++++). O pequeno número de casos tipo I, bem como o pequeno número de casos FXIIIa<sup>+</sup> (++) ou (+++), não permitiu a análise estatística de sua associação. Deve ser destacado que as células TM<sup>+</sup> foram semiquantificadas como ++, +++ e ++++ nas três amostras de tipo histológico I, respectivamente.

As células FXIIIa<sup>+</sup> foram consideradas ausentes ou escassas na maior parte das amostras. No entanto, em 14/22 casos (63,6%) elas eram numerosas na derme papilar e/ou reticular ao redor e adjacente à lesão (Figura 3).

*cally significant association was found between the various histological types (II and III) and the quantity of TM<sup>+</sup> cells ( $p = 0.13$ ) although there was a tendency of association between histological type II and higher semiquantification of TM<sup>+</sup> cells (+++ and ++++ cases). The small number of type I cases, as well as the small number of FXIIIa<sup>+</sup> (++) or (+++) cases did not enable a statistical analysis of their association. It should be pointed out that TM<sup>+</sup> cells were semiquantified as ++, +++ and ++++ in the three histological type I samples, respectively.*

*Factor XIIIa<sup>+</sup> cells were considered absent or scarcely present in most samples. However, in 14/22 cases (63.6%) they were numerous in the papillary and/or reticu-*

Tabela 2: Associação dos resultados relativos aos tipos histológicos de granuloma anular e semiquantificação de TM+, de acordo com os grupos especificados. / *Table 2: Association of results regarding granuloma annulare histological types and semi-quantification of TM+, according to the specified groups.*

Frequência / <i>Frequency</i>	(+ e ++) TM	(+++ e +++)TM	Total
Por linha / <i>Line per</i>			
Por coluna / <i>Column per</i>			
Tipo II	5 35.71 100.00	9 64.29 60.00	14
Tipo III	0 0.00 0.00	6 100.00 40.00	6
Total	5	15	20

Por linha: porcentagem da linha / *Line per: line percentage*

Por coluna: porcentagem da coluna / *Column per: column percentage*

TM: trombomodulina / *TM: thrombomodulin*

Tipo II: tipo histológico II / *Type II: histological type II*

Tipo III: tipo histológico III / *Type III: histological type III*

Figura 3: Hiperplasia de dendrócitos FXIIIa+ na derme papilar e mais profundamente, ao redor da lesão (obj X10).

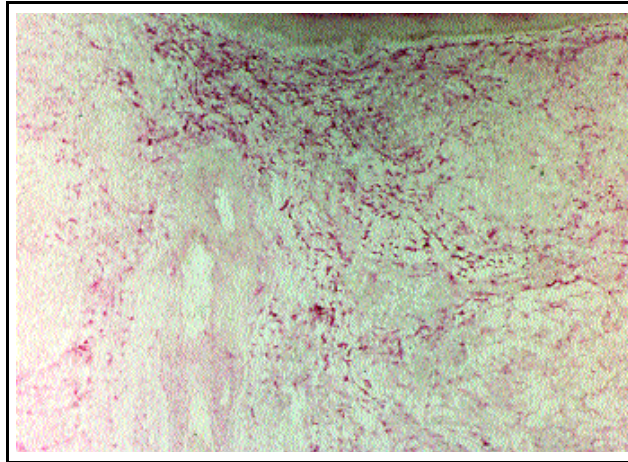


Figure 3: Hyperplasia of FXIIIa+ dendrocytes in the papillary dermis and deeper, around the lesion. (obj X10).

Essas células estavam localizadas tanto entre as fibras colágenas como ao redor dos vasos. A hiperplasia de dendrócitos dérmicos foi considerada presente (P) em 63,6% dos casos, sem significância estatística ( $p = 0,26$ ) quando comparada àquelas nas quais ela estava ausente (A). Além disso, não houve correlação estatística entre (P) ou (A) e a semiquantificação de células FXIIIa+ no ponto da lesão ( $p = 0,24$ ) (Tabela 3).

**DISCUSSÃO**

Os dendrócitos dérmicos fator XIIIa+, as células dérmicas TM+ e os macrófagos CD68+ estão presentes na derme humana normal em pequena quantidade e localizados principalmente na derme papilar e ao redor dos vasos.<sup>7,8,11,15</sup> Esses tipos celulares imunofenotipicamente distintos, mas com morfologia semelhante na coloração de rotina, também estão presentes no infiltrado inflamatório que constitui o quadro histopatológico do granuloma anular com distribuição tissular distinta na lesão. Os macrófagos CD68+ predominam sobre as demais células estudadas. Eles são numerosos, distribuídos difusamente ou em paliçada. As células TM+ também se mos-

lar dermis around and adjacent to the lesion (Figure 3). These cells were located both among collagen fibers and around vessels. Dermal dendrocyte hyperplasia was considered present (P) in 63.6% of the cases with no statistical significance ( $p=0.26$ ) when compared to those in which it was absent (A). In addition, there was no statistical correlation between (P) or (A) and the semiquantification of FXIIIa+ cells in the lesion site ( $p=0.24$ ) (Table 3).

**DISCUSSION**

Factor XIIIa+ dermal dendrocytes, TM+ dermal cells and CD68+ macrophages are present in normal human dermis in a small amount and mainly localized in the papillary dermis and around vessels.<sup>7,8,11,15</sup> Those immunophenotypically distinct cell types but with similar morphology in the routine staining are also present in the inflammatory infiltrate that constitute the histopathological picture of granuloma annulare, with a distinct tissue distribution in the lesional area. CD68+ macrophages predominate over the other cells studied. They are numerous, diffusely distributed or have a palisade arrangement. TM+ cells were

Tabela 3: Associação dos resultados relativos à hiperplasia dendrocítica e semiquantificação de células FXIIIa+, de acordo com os grupos especificados. / Table 3: Association of results regarding dendrocyte hyperplasia and semi-quantification of FXIIIa+ cells, according to the specified groups.

Frequência / Frequency	(A)	(P)	Total
Por linha / Line per			
Por coluna / Column per			
(- e +) FXIIIa	7	12	19
	36.84	63.16	
	85.71	87.50	
(++ e +++) FXIIIa	1	2	3
	33.33	66.67	
	12.50	14.29	
Total	8	14	22

Por linha: porcentagem da linha / Line per: line percentage  
 Por coluna: porcentagem da coluna / Column per: column percentage  
 FXIIIa: fator XIIIa / FXIIIa: factor XIIIa  
 A: Hiperplasia dendrocítica ausente / A: dendrocyte hyperplasia absent  
 P: hiperplasia dendrocítica presente / P: dendrocyte hyperplasia present

traram numerosas e foram consideradas (+++) ou (++++) na maioria dos casos. Essas células mostraram tendência particular para a disposição em paliçada, mesmo quando presentes focalmente e apenas em uma pequena porção do infiltrado de células inflamatórias. Sua quantidade não parece estar relacionada ao tipo histológico. As células fator XIIIa<sup>+</sup> eram ausentes ou escassas. Só em 13,6% dos casos elas estavam presentes de modo difuso no foco da lesão e semiquantificadas como (++) ou (+++), mas não foi observado o arranjo em paliçada. Foi observada a hiperplasia de dendrócitos dérmicos FXIIIa<sup>+</sup> no tecido dérmico periférico à lesão.

O estudo de Mullans & Helm<sup>16</sup> foi a única referência encontrada relacionada à identificação imunofenotípica dos macrófagos no granuloma anular. Os autores relataram a presença de macrófagos CD68<sup>+</sup>, mas os anticorpos não reagiram com a maioria das células na lesão, o que difere dos achados deste estudo. Ainda que os anticorpos utilizados em ambos fossem os mesmos (DAKO, KP1), não há qualquer menção naquele estudo quanto a um procedimento de recuperação antigênica como o que foi aplicado neste (tampão citrato e microondas) que, segundo o parecer dos autores, aparentemente melhora o desempenho para aquele anticorpo específico.<sup>17,18</sup> Mullans & Helm<sup>16</sup> também investigaram as células FXIIIa<sup>+</sup>, e alguns de seus achados foram semelhantes aos encontrados neste estudo, uma vez que eles relataram a presença de diversos dendrócitos dérmicos FXIIIa<sup>+</sup> ao redor do infiltrado inflamatório da lesão. Headington<sup>7</sup> e Rowden<sup>19</sup> também mencionaram resumidamente a existência de hiperplasia de dendrócitos dérmicos no granuloma anular, e Sterry & Boehncke<sup>20</sup> apontaram que o aumento de células FXIIIa<sup>+</sup> pode ocorrer dentro e fora das lesões de vários distúrbios inflamatórios da pele.

Por outro lado, células positivas coradas não foram observadas no foco da lesão em todos os casos estudados por Mullans & Helm<sup>16</sup>. No presente relatório, as células FXIIIa<sup>+</sup> foram consideradas presentes em 13,6% dos casos. Pode-se argumentar que o tratamento prévio do tecido com tripsina, não mencionado no trabalho anterior, pode elevar a positividade para o anticorpo antiFXIIIa,<sup>17,18</sup> mas a duração da lesão também pode interferir com os resultados semiquantitativos, explicando as diferenças observadas entre as amostras em relação à quantidade de células observadas. Isso também se aplica aos resultados de anticorpos antiTM, a despeito de a maioria dos casos ser classificada como (+++) ou (++++). Quanto às células TM<sup>+</sup>, não foram encontrados outros relatos para a comparação de resultados. Uma relação entre a quantidade de células TM<sup>+</sup> e a quantidade de células FXIIIa<sup>+</sup> não pôde ser estabelecida, já que a presença de uma não parece interferir com a da outra. Entretanto, foi apontada uma "tendência de associação" entre quantidades maiores de células TM<sup>+</sup> e quantidades menores de células FXIIIa<sup>+</sup>.

Os dendrócitos dérmicos fator XIIIa<sup>+</sup> e as células TM<sup>+</sup>, cada um expressando moléculas com funções distintas no processo de hemostase, apresentaram distribuição quase oposta no granuloma anular, dentro e fora da lesão tissular. Os processos

also numerous and considered as (+++) or (++++) in most cases. These cells showed a particular tendency to the palisade arrangement, even when they were focally present and only a small part of the inflammatory cell infiltrate. Their quantity does not appear to be related to the histological type. Factor XIIIa<sup>+</sup> cells were absent or scarce. Only in 13.6% of the cases they were diffusely present in the lesion focus and semiquantified as (++) or (+++), but no palisade arrangement was observed. Hyperplasia of FXIIIa<sup>+</sup> dermal dendrocytes in the dermal perilesional tissue was observed.

Mullans & Helm's study<sup>16</sup> was the only reference we could find regarding the immunophenotypic identification of macrophagic cells in granuloma annulare. The authors reported the presence of CD68<sup>+</sup> macrophages, but the antibody did not react with most of the cells in the lesion, which is different from our findings. Although the antibody used in both studies could be the same (DAKO, KP1), there is no mention in that report to an antigenic recovery procedure such as that applied by us (citrate buffer and microwave cooking) which in our experience seems to give a stronger performance for that particular antibody.<sup>17,18</sup> Those authors<sup>16</sup> also investigated FXIIIa<sup>+</sup> cells and some of their findings are similar to ours, as they reported the presence of numerous FXIIIa<sup>+</sup> dermal dendrocytes around the inflammatory infiltrate of the lesion. Headington<sup>7</sup> and Rowden<sup>19</sup> also mentioned briefly the existence of hyperplasia of dermal dendrocytes in granuloma annulare and Sterry & Boehncke<sup>20</sup> pointed out that increase of FXIIIa<sup>+</sup> cells may occur inside and outside of several inflammatory skin diseases.

On the other hand, positive stained cells were not seen in the lesion focus, in all cases studied by Mullans & Helm.<sup>16</sup> In the present report, FXIIIa<sup>+</sup> cells were considered present in 13.6% of the cases. We could argue that previous treatment of the tissue with trypsin, not mentioned in the former paper, can enhance positivity for the anti-FXIIIa antibody<sup>17,18</sup> but the duration of the lesion could also interfere in the semiquantitative results, explaining the differences in the cell amounts observed between samples. That also applies to the results of anti-TM antibody in spite of most cases being classified as (+++) or (++++). Concerning the TM<sup>+</sup> cells, we could not find any other report for comparison of results. A relation between the amount of TM<sup>+</sup> cells and the amount of FXIIIa<sup>+</sup> cells could not be established, such that the presence of one does not appear to interfere with the other. However, it was pointed out that a "tendency for association" was observed between greater amounts of TM<sup>+</sup> cells and the lesser amounts of FXIIIa<sup>+</sup> cells.

Factor XIIIa<sup>+</sup> dermal dendrocytes and TM<sup>+</sup> cells, each expressing molecules with distinct functions in the hemostasis process, have presented an almost opposite distribution in granuloma annulare, inside and outside the tissue lesion. Coagulation and anticoagulation processes are linked to the inflammatory events. The two mentioned molecules also seem to play a role in inflammatory reactions. Factor XIIIa<sup>+</sup> cells are



de coagulação e anticoagulação estão ligados aos eventos inflamatórios. As duas moléculas mencionadas também parecem exercer uma função nas reações inflamatórias. As células fator XIIIa<sup>+</sup> estão envolvidas no mecanismo de reparo tissular, onde funcionam como moduladores da síntese de colágeno<sup>9</sup> Ao mesmo tempo, a hiperplasia celular constitui uma resposta importante do tecido conjuntivo no processo de cura, como a proliferação de fibroblastos e células endoteliais. A hiperplasia de dendrócitos dérmicos fator XIIIa<sup>+</sup> na periferia da lesão de granuloma anular pode indicar um período inicial ou precoce do processo de reparo tissular, já que tais células estariam diminuídas na fase de organização das fibras colágenas, que é subsequente à etapa fibroproliferativa.<sup>21</sup>

A função e a regulação das moléculas de TM nos processos inflamatórios não são bastante conhecidos. As citocinas parecem causar sua diminuição, enquanto o dano vascular aumenta seus níveis circulatórios. A presença de numerosas células TM<sup>+</sup> no infiltrado inflamatório do granuloma anular, principalmente após a consideração de que elas são escassas na derme normal, sugere sua participação na patogênese da lesão ou que os eventos inflamatórios que estão ocorrendo fazem com que a trombosmodulina seja expressa por células que normalmente não o fariam. Poder-se-ia especular que a expressão mais alta de TM observada seria mediada pelas citocinas, mas esse argumento não pode ser sustentado já que existem pouquíssimos estudos relatando tanto o efeito modelador das citocinas na expressão de TM quanto o perfil dessas substâncias no granuloma anular. Seja qual for o caso, se houver moduladores diferentes para a expressão de TM no contexto da lesão tissular do granuloma anular, o balanço total seria para uma elevação.

A síntese de trombosmodulina está fortemente ligada a eventos vasculares. O dano vascular é evitado pelo efeito antiinflamatório da proteína C, que é liberada após a formação do complexo trombina-TM<sup>12</sup> Da mesma forma, a TM tissular (como a expressa nas células dérmicas) pode ter uma função no processo inflamatório, limitando os danos secundários à inflamação.<sup>22</sup> A ação anticoagulante e antiinflamatória da proteína C ativada pela TM<sup>12,23</sup> daria suporte a essa hipótese. Além disso, a expressão TM é potencializada em vários distúrbios inflamatórios.<sup>11,22</sup> A resposta inflamatória está por sua vez fortemente ligada ao processo de cura. Assim, podem ser levantadas duas suposições relacionadas. A primeira é a de que a TM das células dérmicas que formam o infiltrado celular no granuloma anular, por um efeito antiinflamatório, limitam o dano tissular dérmico. Isso pode ser apoiado pela tendência observada de associação entre o tipo histológico II (que apresenta menos necrobiose colágena) e a semiquantificação mais alta de células TM<sup>+</sup>. A segunda suposição é a de que o efeito antiinflamatório da TM não só limita o dano ao tecido dérmico, como também interfere ou modula o processo de cura da derme. Isso está de acordo com a tendência observada de associação entre a semiquantificação mais alta das células TM<sup>+</sup> e a semiquantificação mais baixa das células FXIIIa<sup>+</sup>, com função nos processos iniciais

*involved in the tissue recovery mechanism, where they function as collagen synthesis modulators.<sup>9</sup> At the same time, cell hyperplasia is an important response of the connective tissue in the healing process, such as proliferation of fibroblasts and endothelial cells. Factor XIIIa<sup>+</sup> dermal dendrocyte hyperplasia at the periphery of the lesion in granuloma annulare could indicate an initial or early period of the tissue recovery process, since those cells would be diminished in the phase of collagen fibers setting that is subsequent to the fibroproliferative step.<sup>21</sup>*

*The role and regulation of TM molecules in inflammatory processes are not widely known. Cytokines appear to cause its reduction, while vascular damage would increase its circulatory levels. The presence of numerous TM<sup>+</sup> cells in the inflammatory infiltrate of the granuloma annulare, specially considering that they are scant in the normal dermis, suggests their participation in the pathogenesis of the lesion or that the inflammatory events that are taking place cause thrombosmodulin to be expressed by cells that normally don't do so. Although we could speculate that the greater TM expression found could be mediated by the cytokines, we can not sustain this argument since there are very few studies reporting both the modulator effects of cytokines on TM expression, and the profile of those substances in granuloma annulare lesion. Whatever the case, if there are different modulators for TM expression in the context of the tissue lesion of granuloma annulare, the whole balance would be that of an increased one.*

*Thrombosmodulin synthesis is strongly linked to vascular events. Vascular damage is avoided by the anti-inflammatory effect of protein C which is released after the thrombin-TM complex formation.<sup>12</sup> Likewise, tissue TM (such as that expressed on dermal cells) could play a role in the inflammatory process limiting the damage secondary to inflammation.<sup>22</sup> The anticoagulant and anti-inflammatory action of protein C activated by the TM<sup>12,23</sup> would support this hypothesis. Besides TM expression is enhanced in several inflammatory diseases.<sup>11,22</sup> The inflammatory response is in turn strongly linked to the healing process. Thus, one could offered two related suppositions. The first is that the TM of the dermal cells that form the cellular infiltrate in granuloma annulare, by an anti-inflammatory effect, would limit the dermal tissue damage. That is supported by the observed tendency of association between the histological type II (the one with less collagen necrobiosis) and the higher semiquantification of TM<sup>+</sup> cells. The second supposition is that the TM anti-inflammatory effect could not only limit the damage to the dermal tissue, but also interfere or modulate the dermis healing process. This would be in accordance with the observed tendency of association between the higher semiquantification of TM<sup>+</sup> cells and the lower semiquantification of FXIIIa<sup>+</sup> cells, which would function in the early recovery*

de recuperação. Tais suposições teriam validade estatística com a análise de um número maior de casos, o que não foi possível até este momento.

### CONCLUSÃO

A distribuição distinta de células FXIIIa<sup>+</sup> e de células TM<sup>+</sup> na histologia do granuloma anular pode ser um reflexo das funções diferentes, mas complementares que elas apresentam, como previamente sugerido:<sup>11</sup> enquanto as células que expressam a TM na área necrobiótica agiram no processo evolutivo da lesão, os dendrócitos dérmicos FXIIIa<sup>+</sup> na periferia estariam ligados à recuperação do tecido dérmico. □

### REFERÊNCIAS / REFERENCES

- 1- Dahl MV, Ullman S, Goltz RW. Vasculitis in granuloma annulare. *Arch Dermatol* 1977; 113: 463.
- 2- Nieboer C, Kalsbeek GL. Direct immunofluorescence studies in granuloma annulare, necrobiosis lipoidica and granulomatosis disciformis Miescher. *Dermatologica* 1979; 158: 427.
- 3- Gudmundsen K, Smith O, Dervan P, Powell FC. Necrobiosis lipoidica and sarcoidosis. *Clin Exp Dermatol* 1991; 16:287.
- 4- Gange RW, Black MM, Carrington P. Defective neutrophil migration in granuloma annulare, necrobiosis lipoidica and sarcoidosis. *Arch Dermatol* 1979; 115:32.
- 5- Koh MS., Majewski BBJ, Barter S, Rhodes EL. Polymorphonuclear and mononuclear leucocyte function in necrobiosis lipoidica and granuloma annulare. *Arch Dermatol Res* 1993; 275:45.
- 6- Ahmed AA, Nordlind K, Schultzberg M, Lidén S. Interleukin-1 alpha- and beta-, interleukin-6- and tumor necrosis factor- alpha-like immunoreactivities in chronic granulomatous skin conditions. *Acta Derm Venereol* 1994; 74:435.
- 7- Headington JT. The dermal dendrocyte. *Adv Dermatol* 1986; 1:159.
- 8- Cerio R, Griffiths CEM, Cooper KD, Nickoloff BJ, Headington JT. Characterization of factor XIIIa positive dermal dendritic cells in normal and inflamed skin. *Brit J Dermatol* 1989; 121:421.
- 9- Paye M, Nusgens BV, Lapière CM. Factor XIII of blood coagulation modulates collagen biosynthesis by fibroblasts in vitro. *Haemostasis* 1989; 19:274.
- 10- Greenberg CS, Birckbichler PJ, Rice RH. Transglutaminases: multifunctional cross-linking enzymes that stabilize tissues. *FASEB J* 1991; 5:3071.
- 11-Cuzzi-Maya T, Sidbury R, Epstein WL, Fukuyama K. Thrombomodulin expression on dermal cells in normal and psoriatic skin. *Arch Dermatol Res* 1998; 290: 233.
- 12- Esmon CT. The regulation of natural anticoagulant pathways. *Science* 1987; 235: 1348.
- 13-Esmon CT. The roles of protein C and thrombomodulin in the regulation of blood coagulation. *J Biol Chem* 1989; 264:4743.
- 14- Sánchez CP, Barea FL, Contreras F. Granuloma en empalizada. *Actas Dermosifiliogr* 1980; 71:447.

*processes. These hypotheses could gain statistical validity through the analysis of a greater number of cases, what has not been possible to date.*

### CONCLUSION

*The distinct distribution of the FXIIIa<sup>+</sup> cells and TM<sup>+</sup> cells in the histologic lesion of granuloma annulare can reflect the different but complementary roles they play, as previously suggested:<sup>11</sup> while the cells expressing TM in the necrobiotic area would act in the processes involved in the course of the lesion and FXIIIa<sup>+</sup> dermal dendrocytes in the periphery would be linked to the recovery of dermal tissue.* □

- 15- Weber-Matthiesen K, Sterry W. Organization of the monocyte/macrophage system of normal human skin. *J Invest Dermatol* 1990; 95:83.
- 16- Mullans E, Helm KF. Granuloma Annulare: an immunohistochemical study. *J Cutan Pathol.* 1994; 21:135.
- 17- Taylor CR, Cote RJ. Immunomicroscopy: a diagnostic tool for the surgical pathologist. 2nd ed. WB Saunders Company, 1994:42-70.
- 18- Rosai J. Ackerman's surgical pathology. 8th ed. Mosby-Year Book Inc, 1996:29-62
- 19-Rowden G. Macrophages and dendritic cells in the skin. In: Boss, J. D. Skin immune system. 2nd ed. Boca Raton: Ed. CRC Press, 1997. P. 109-146.
- 20- Sterry W, Boehncke W. Phenotypic heterogeneity of the dermal monocyte/macrophage system. In: Nickoloff, B. J. Dermal Immune System. Boca Raton: Ed. CRC Press, 1993. P. 67-89.
- 21- Piérard GE, Arrese-Estrada J, Piérard-Franchimont C, Deleixhe-Mauhain F. Is there a link between dendrocytes, fibrosis and sclerosis? *Dermatologica* 1990; 181: 264.
- 22- Conway EM, Nowakowski B. Biologically active thrombomodulin is synthesized by adherent synovial fluid cells and is elevated in synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Blood* 1993; 81:726.
- 23- Esmon CT. Inflammation and thrombosis: the impact of inflammation on the protein C anticoagulant pathway. *Haematologica* 1995; 80:49.

### ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA: / MAILING ADDRESS:

*Claudia Regina Wanderley Soub  
Rua Sá Ferreira 184 apto 603 - Copacabana  
Rio de Janeiro RJ 22071-100  
Tel/Fax: (21) 2247-3232  
E-mail: csoub@uol.com.br*