

Adriana Borba Guimarães

**Análise dos rearranjos gênicos de cadeias pesada e leves da imunoglobulina
pela técnica de reação em cadeia da polimerase no auxílio diagnóstico de
processos linfoproliferativos cutâneos de células B**

São Paulo

2022

Adriana Borba Guimarães

**Análise dos rearranjos gênicos de cadeias pesada e leves da imunoglobulina
pela técnica de reação em cadeia da polimerase no auxílio diagnóstico de
processos linfoproliferativos cutâneos de células B**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título
de Doutor em Ciências

Programa de Dermatologia

Orientador: Prof. Dr. José Antonio Sanches Junior

Coorientadora: Profa. Dra. Maria Claudia Nogueira
Zerbini

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 1 de novembro de 2011.
A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

São Paulo

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Guimarães, Adriana Borba
Análise dos rearranjos gênicos de cadeias pesada e leves da imunoglobulina pela técnica de reação em cadeia da polimerase no auxílio diagnóstico de processos linfoproliferativos cutâneos de células B / Adriana Borba Guimarães. -- São Paulo, 2022.
Tese (doutorado) -- Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Dermatologia.
Orientador: José Antonio Sanches Junior.
Coorientadora: Maria Claudia Nogueira Zerbini.

Descritores: 1.Linfoma de células B
2.Pseudolinfoma 3.Reação em cadeia de polimerase
4.Rearranjo gênico 5.Cadeias leves de imunoglobulina 6.Cadeias pesadas de imunoglobulina

USP/FM/DBD-358/22

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Dedico esta tese a Deus, por me guiar nesta existência.

AGRADECIMENTOS

Expresso meu sentimento de gratidão e admiração ao meu orientador Professor Doutor José Antonio Sanches pela oportunidade, sabedoria e convívio ao longo dos anos. Que me permitiu amadurecimento como profissional dermatologista e como pessoa. Que me tocou na busca contínua de conhecimento e cuidado com os pacientes.

Da mesma forma expresso meu sentimento de gratidão e admiração à minha coorientadora Professora Doutora Maria Claudia Nogueira Zerbini pela transferência de conhecimento, sensibilidade e convivência ao longo desses anos. Com certeza umas das pessoas mais sábias que conheci, que me tocou tanto por sua sabedoria e competência quanto pela humildade.

Minha eterna gratidão à minha mãe, sempre me apoiando incondicionalmente nas minhas decisões. Que apesar de estar longe fisicamente; sempre esteve próxima no apoio, carinho, compreensão e palavras de ânimo nos vários momentos de dificuldades e fraqueza. Agradeço aos meus irmãos, grandes amigos e demais familiares, que sempre me apoiaram durante estes anos e compreenderam minhas ausências em prol dos meus projetos. Agradeço ao Halsted pelo companheirismo, carinho e apoio durante estes anos; seu auxílio foi muito valioso na construção desta tese ao longo dos anos.

Agradeço:

Ao Dr Denis Ricardo Miyashiro, Dra Jade Cury-Martins e Dra Roberta Vasconcelos Berg pelo auxílio e convívio durante os anos.

À Profa. Dra. Juliana Pereira e aos funcionários do Laboratório de Hematologia em especial ao Hebert Fabricio Culler pelo trabalho, disponibilização dos recursos e auxílio técnico.

Aos funcionários do setor da Dermatologia, do Laboratório de Histopatologia da Dermatologia e do Arquivo Médico do HCFMUSP, em especial ao Marcelo Alves da silva, Ruth Eugênio Meneses, Rosângela Evangelista de Souza e Flavia Maria Correia Cristaldi.

Ao Fundo de Apoio à Dermatologia do Estado de São Paulo – Sebastião Sampaio (FUNADERSP) pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

A todos pacientes do Ambulatório de Linfomas Cutâneos do HCFMUSP, meus sinceros respeito e agradecimento por me motivarem na busca diária de novos conhecimentos.

RESUMO

Guimarães AB. *Análise dos rearranjos gênicos de cadeias pesada e leves da imunoglobulina pela técnica de reação em cadeia da polimerase no auxílio diagnóstico de processos linfoproliferativos cutâneos de células B* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2022.

Processos linfoproliferativos cutâneos de células B (PLPCB) incluem pseudolinfomas, proliferações linfoides atípicas e linfomas. Os linfomas cutâneos primários de células B (LCPCB) representam aproximadamente 20-25% de todos os linfomas cutâneos primários. Pseudolinfoma (PLC) é uma lesão de pele benigna, que se assemelha, em sua forma clínica e/ou histológica aos linfomas cutâneos. O diagnóstico diferencial entre o PLC e LCPCB pode ser muito difícil. A pesquisa dos rearranjos gênicos das cadeias pesada (IgH) e leves kappa (IgK) e lambda (IgL) da imunoglobulina (Ig) através da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), tem sido utilizada como método auxiliar no diagnóstico dos LCPCB. **Objetivos principais:** avaliar a aplicabilidade da técnica de PCR (baseada no protocolo EuroClonality/BIOMED-2) para pesquisa de clonalidade através da análise dos rearranjos gênicos das cadeias pesada e leves de Ig em material proveniente de biópsias cutâneas de pacientes acompanhados no Ambulatório de Linfomas Cutâneos do HCFMUSP que tiveram diagnóstico de PLPCB (PLC, LCPCB ou indefinição diagnóstica entre ambos). **Objetivos secundários:** avaliar o auxílio diagnóstico do estudo de rearranjo gênico de Ig por PCR nos casos de PLPCB com indefinição diagnóstica. Identificar a contribuição do protocolo de investigação diagnóstica (PID) e algoritmo propostos para a conclusão diagnóstica final e definição de conduta de casos de PLPCB com dificuldade diagnóstica. **Métodos:** Os pacientes foram submetidos ao PID através de avaliação dos critérios clínico-evolutivos (CE), histopatológicos associado a imuno-histoquímicos (HP+IHQ) e pesquisa de clonalidade pela análise do rearranjo gênico da Ig por PCR. Os resultados dos critérios foram associados à escala de pontuações. **Resultados:** Na pesquisa de clonalidade do rearranjo gênico da cadeia pesada, observou-se monoclonalidade em 57,1% (20/35) dos casos avaliados. Na avaliação da clonalidade do rearranjo gênico das cadeias leves, observou-se monoclonalidade em 51,4% (18/35) dos casos avaliados. Nos resultados finais dos critérios avaliados no PID referente aos casos estudados, observou-se casos compatíveis com linfomas cutâneos em 32,4% (11/34) pelo critério CE, 62,9% (22/35) de casos compatíveis com linfomas cutâneos pela avaliação HP+IHQ e resultados monoclonais por estudo de rearranjo gênico de Ig em 77,1% (27/35) dos casos. Observou-se significância estatística na associação entre o grau de suspeição clínica-evolutiva e o resultado histopatológico-imunohistoquímico ($p=0.021$) pelo teste do qui-quadrado e teste exato de Fisher. Ao se considerar possibilidade da clonalidade por PCR no estudo do rearranjo gênico como método padrão-ouro na diferenciação entre processo linfoproliferativo maligno e benigno, foram calculados valor ideal de corte da pontuação final dos escores do PID igual a 4, com sensibilidade de 100% e especificidade de 33,33 % (pelo índice de Youden). A melhor especificidade foi determinada a partir da pontuação ≥ 9 (sensibilidade de 38,5% e especificidade de 100%). A acurácia da pontuação final foi de 80,13% (através da curva ROC). **Conclusões:** o presente estudo possibilitou o auxílio diagnóstico de casos de PLPCB através do estudo de rearranjo gênico de Ig por PCR na associação com critérios clínico-evolutivos, histopatológicos e imunohistoquímicos. O PID permitiu a realização de um algoritmo de conclusão diagnóstica final e conduta de casos de PLPCB com dificuldade diagnóstica. Os resultados do PID possibilitou a avaliação de

diferenciação entre processo linfoproliferativo maligno e benigno através de valor ideal de corte da pontuação final dos escores com adequada especificidade e acurácia.

Palavras-chave: Linfoma de células B; Pseudolinfoma; Reação em cadeia de polimerase; Rearranjo gênico; Cadeias leves de imunoglobulina; Cadeias pesadas de imunoglobulinas.

ABSTRACT

Guimarães AB. *Analysis of clonal immunoglobulin chain gene rearrangement by the technique of polymerase chain reaction (PCR) to aid in the diagnosis of cutaneous B-cell lymphoproliferative processes* [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2022.

B-cell cutaneous lymphoproliferative processes (PLPCB) include pseudolymphomas, atypical lymphoid proliferations and lymphomas. Primary cutaneous B-cell lymphomas (LCPCB) are approximately 20-25% of all primary cutaneous lymphomas. Pseudolymphoma (PLC) is a lymphomatous skin lesion mimicking lymphomas. The differential diagnosis between PLC and LCPCB can be very difficult. The research for gene rearrangement of the heavy (IgH) and kappa (IgK) and lambda (IgL) light chains of immunoglobulin (Ig) through the polymerase chain reaction (PCR) technique has been used as an auxiliary method in the diagnosis of LCPCB. Main objectives: to evaluate the applicability of the PCR technique (based on the EuroClonality/BIOMED-2 protocol) for B-cell clonality research through the gene rearrangement of Ig heavy and light chains in material from skin biopsies of patients followed by diagnostic of PLPCB (PLC, LCPCB or uncertainty between them). Secondary objectives: evaluation of the diagnostic aid of analysis of the Ig gene rearrangement by PCR in cases of PLPCB with diagnostic uncertainty. To identify the contribution of the diagnostic investigation protocol (PID) proposed for the final diagnostic conclusion and definition of the management of cases of PLPCB with diagnostic difficulties. Methods: The patients were submitted with PID through the evaluation of clinical-evolutionary (CE), histopathological criteria associated with immunohistochemical (HP + IHQ) and analysis of the Ig gene rearrangement by PCR. The results of the criteria were associated with the scale of scores. Results: In the clonality research of the IgH gene rearrangement, monoclonality was observed in 57,1% (20/35) of the evaluated cases. In the evaluation of the clonality of the light chain gene rearrangement, monoclonality was observed in 51,4% (18/35) of the cases evaluated. In the final results of the criteria evaluated in the PID for the cases studied, compatible cases of cutaneous lymphomas were observed in 32,4% (11/34) by the CE criteria, 62,9% (22/35) of cases compatible with cutaneous lymphomas by HP+IHC assessment and monoclonal results by Ig gene rearrangement study in 77,1% (27/35) of cases. There was statistical significance in the association between the clinical-evolutionary suspicion and the histopathological-immunohistochemical result ($p=0.021$) by the chi-square test and Fisher's exact test. When considering PCR clonality in the study of gene rearrangement as the gold standard method at PID for differentiating between malignant and benign lymphoproliferative processes, the optimal cut-off value of the final PID score equal to 4 was calculated, with 100% sensitivity and specificity of 33,33 % (by the Youden index). The best specificity was determined from the score ≥ 9 (sensitivity of 38,5% and specificity of 100%). The accuracy of the final score was 80,13% (by ROC curve). Conclusions: the present study made it possible to help diagnose cases of PLPCB through the study of gene rearrangement of Ig by PCR in association with clinical-evolutionary, histopathological and immunohistochemical criteria. The PID allowed for an organization chart to conclude the diagnosis and management cases of PLPCB with diagnostic difficulties. The PID results made it possible to assess the differentiation between malignant and benign lymphoproliferative processes through the ideal cut-off value of the final score, with adequate specificity and accuracy.

Keywords: B-cell lymphoma; Pseudolymphoma; Polymerase Chain Reaction; Gene rearrangement; Immunoglobulin Light Chains; Immunoglobulin Heavy Chains.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Etiologia dos pseudolinfomas cutâneos.....	29
Figura 2 - Classificação dos tratamentos dos pseudolinfomas cutâneos conforme etiologia...	52
Figura 3 - Representação esquemática dos subtipos principais de linfomas MALT cutâneos	59
Figura 4 - Revisão das áreas de drenagem linfonodal para determinação da classificação do acometimento cutâneo de LCPCT não-MF/SS e LCPCB.....	65
Figura 5 - Representação esquemática bidimensional da imunoglobulina.....	68
Figura 6 - Representação cromossômica dos loci das cadeias pesada e leves (kappa e lambda) das imunoglobulinas.....	69
Figura 7 - Representação esquemática do rearranjo da cadeia pesada da imunoglobulina.....	71
Figura 8 - Algoritmo para diagnóstico de clonalidade em suspeita de linfoproliferações com diagnóstico inconclusivo ou histologia, imunofenótipo ou apresentação clínica incomuns baseado no PCR multiplex (protocolo EuroClonality/BIOMED-2).....	75
Figura 9 - Casuística do estudo.....	77
Figura 10 - Pontuação final da associação dos critérios clínicos e evolutivos pelo protocolo de investigação diagnóstica proposto para o estudo de processos linfoproliferativos cutâneos de células B.....	81
Figura 11 - Descrições técnicas e diferentes apresentações da análise da cadeia pesada de imunoglobulina pelo tubo A do PCR multiplex.....	88
Figura 12 - Gráfico tipo box-plot de avaliação da variável idade na admissão (anos).....	94
Figura 13 - Gráfico tipo box-plot de avaliação da variável tempo de evolução até a primeira avaliação (meses).....	94
Figura 14 - Gráfico tipo box-plot de avaliação da variável tempo de seguimento (meses)....	94
Figura 15 - Acurácia da pontuação final pela curva ROC.....	108
Figura 16 - Algoritmo proposto para conclusão final do protocolo de investigação diagnóstica.....	117

Quadro 1 - Associação dos resultados do critério clínico-evolutivo em relação aos resultados do critério histopatológico associado ao imunohistoquímico dos 34 pacientes avaliados de processos linfoproliferativos cutâneos de células B pelo protocolo proposto.....	105
Quadro 2 - Associação dos resultados do critério clínico-evolutivo em relação aos resultados da pesquisa do rearranjo gênico da imunoglobulina dos 33 pacientes avaliados de processos linfoproliferativos cutâneos de células B pelo protocolo proposto	106
Quadro 3 - Associação dos resultados do critério histopatológico associado ao imunohistoquímico em relação aos resultados da clonalidade B dos 34 pacientes avaliados de processos linfoproliferativos cutâneos de células B pelo protocolo proposto.....	106
Quadro 4 - Contribuição diagnóstica da pesquisa do rearranjo gênico da imunoglobulina em relação aos resultados da associação dos critérios clínico-evolutivos e histopatológicos associados a imunohistoquímicos.....	109

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais drogas desencadeadoras de pseudolinfomas	30
Tabela 2 - Classificação dos pseudolinfomas cutâneos conforme predomínio do infiltrado linfocitário	33
Tabela 3 - Classificação dos pseudolinfomas cutâneos conforme associação com entidades clínico-patológicas.....	34
Tabela 4 - Classificação de pseudolinfomas cutâneos baseada em características clínicas e histopatológicas	36
Tabela 5 - Classificação dos linfomas cutâneos da OMS - EORTC revisada em 2018	55
Tabela 6 - Estadiamento de LCPCT não-MF/SS e LCPCB (EORTC/ISCL/USCLC)	64
Tabela 7 - Avaliação do critério clínico pelo protocolo de investigação diagnóstica proposto para o estudo de processos linfoproliferativos cutâneos de células B.....	80
Tabela 8 - Avaliação do critério evolutivo pelo protocolo de investigação diagnóstica proposto para o estudo de processos linfoproliferativos cutâneos de células B.....	80
Tabela 9 - Avaliação do critério clínico-evolutivo pelo protocolo de investigação diagnóstica proposto para o estudo de processos linfoproliferativos cutâneos de células B.....	81
Tabela 10 - Protocolo semiquantitativo para avaliação imuno-histoquímica do proposto estudo	83
Tabela 11 - Avaliação do critério histopatológico associado ao imuno-histoquímico pelo protocolo de investigação diagnóstica proposto para o estudo de processos linfoproliferativos cutâneos de células B.....	84
Tabela 12 - Avaliação do critério de pesquisa de clonalidade pela análise do rearranjo gênico da imunoglobulina pelo protocolo de investigação diagnóstica proposto para o estudo de processos linfoproliferativos cutâneos de células B.....	90
Tabela 13 - Protocolo de investigação diagnóstica proposto para o estudo de processos linfoproliferativos cutâneos de células B	90
Tabela 14 - Resultados das frequências e porcentagens das variáveis sexo, raça/cor e estado de saúde na última avaliação dos 35 pacientes estudados de processos linfoproliferativos cutâneos de células B.....	92
Tabela 15 - Resultados analíticos de valor mínimo, quartil 25%, mediana, quartil 75% e valor máximo das variáveis de idade na admissão, tempo de evolução até a primeira consulta e tempo de seguimento dos 35 pacientes estudados de processos linfoproliferativos cutâneos de células B	93
Tabela 16 - Topografia das lesões dos pacientes de processos linfoproliferativos cutâneos de células B do proposto estudo	95
Tabela 17 - Topografia das lesões localizadas em região de cabeça e pescoço dos pacientes de processos linfoproliferativos cutâneos de células B do proposto estudo.....	95
Tabela 18 - Topografia das lesões localizadas em membros inferiores dos pacientes de processos linfoproliferativos cutâneos de células B do proposto estudo	95
Tabela 19 - Morfologia das lesões dos 35 pacientes de processos linfoproliferativos cutâneos de células B do proposto estudo	96
Tabela 20 - Quantidade de lesões dos 35 pacientes de processos linfoproliferativos cutâneos de células B do proposto estudo	96

Tabela 21 - Resultados descritivos dos critérios clínicos dos 35 pacientes estudados de processos linfoproliferativos cutâneos de células B segundo protocolo de investigação diagnóstica proposto	96
Tabela 22 - Resultados descritivos dos critérios evolutivos dos 34 pacientes estudados de processos linfoproliferativos cutâneos de células B segundo protocolo de investigação diagnóstica proposto	97
Tabela 23 - Resultados descritivos dos critérios clínico-evolutivos dos 34 pacientes estudados de processos linfoproliferativos cutâneos de células B segundo protocolo de investigação diagnóstica proposto	97
Tabela 24 - Resultados descritivos dos critérios HP+IHQ dos 35 pacientes estudados de processos linfoproliferativos cutâneos de células B segundo protocolo de investigação diagnóstica proposto	98
Tabela 25 - Resultados descritivos dos subtipos histológicos pelo critério de HP+IHQ dos pacientes estudados de processos linfoproliferativos cutâneos de células B segundo protocolo de investigação diagnóstica proposto	98
Tabela 26 - Resultados da pesquisa de clonalidade pela análise do rearranjo gênico da cadeia pesada da imunoglobulina dos pacientes estudados de processos linfoproliferativos cutâneos de células B segundo protocolo de investigação diagnóstica proposto	99
Tabela 27 - Resultados da pesquisa de clonalidade pela análise do rearranjo gênico das cadeias leves da imunoglobulina dos pacientes estudados de processos linfoproliferativos cutâneos de células B segundo protocolo de investigação diagnóstica proposto	100
Tabela 28 - Conclusão final da pesquisa de clonalidade pela análise do rearranjo gênico das cadeias pesada e leves da imunoglobulina pelo PCR multiplex do protocolo de investigação diagnóstica proposto para o estudo de processos linfoproliferativos cutâneos B.....	101
Tabela 29 - Tipos de amostras cutâneas avaliadas na pesquisa de clonalidade pela análise do rearranjo gênico da imunoglobulina do protocolo de investigação diagnóstica proposto para o estudo de processos linfoproliferativos cutâneos de células B.....	102
Tabela 30 - Resultados da pesquisa de clonalidade pelo estudo do rearranjo gênico do TCR γ do protocolo de investigação diagnóstica proposto para o estudo de processos linfoproliferativos cutâneos de células B	102
Tabela 31 - Tipos de amostras cutâneas avaliadas na pesquisa de clonalidade pelo estudo do rearranjo gênico do TCR γ do protocolo de investigação diagnóstica proposto para o estudo de processos linfoproliferativos cutâneos de células B.....	103
Tabela 32 - Resultados descritivos dos critérios avaliados no protocolo de investigação diagnóstica proposto dos pacientes estudados de processos linfoproliferativos cutâneos de células B	104
Tabela 33 - Resultados de sensibilidade e especificidade de acordo com a pontuação final do protocolo de investigação diagnóstica.....	107
Tabela 34 - Resultados descritivos da contribuição diagnóstica da pesquisa do rearranjo gênico da Ig em relação aos resultados da associação dos critérios CE e HP+IHQ do protocolo de investigação diagnóstica proposto para o estudo de PLPCB.....	110

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC	amostra congelada
AFFIP	amostra fixada em formol e incluída em parafina
APACHE	angioqueratoma pseudolinfomatoso acral de crianças
BCR	<i>B-cell receptor</i>
bp	pares de base
BM	biologia molecular
C	região constante
CAPPesq	Comissão de Ética para análise de projetos de pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CDF	células dendríticas foliculares
CDR	regiões determinantes de complementaridade
CE	clínico-evolutivo
CED	com evidência de doença
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
D	região de diversidade
DHL	desidrogenase láctica
DNA	ácido desoxirribonucleico
EBV	Epstein-Barr vírus
EORTC	<i>European Organisation for Research and Treatment of Cancer</i>
FR	<i>framework</i>
Gy	<i>gray</i>
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HE	hematoxilina & eosina
HIV	vírus da imunodeficiência humana
HLC	hiperplasia linfoide cutânea
HP	histopatológico
HSM	hipermutação somática
HSV	herpes simplex virus

HTLV	vírus T-linfotrópico humano
Ig	imunoglobulina
IgH	cadeia pesada da imunoglobulina
IgK	cadeia leve kappa da imunoglobulina
IgL	cadeia leve lambda da imunoglobulina
IHQ	imuno-histoquímica
ISCL	<i>International Society for Cutaneous Lymphomas</i>
J	região de junção
K	Kappa
K/L	relação kappa/lambda
kV	Kilovolt
L	lambda
LB	linfócito B
LC	linfocitoma cútis
LCP	linfoma cutâneo primário
LCPCB	linfoma cutâneo primário de células B
LCPCT	linfoma cutâneo primário de células T/NK
LCPCF	linfoma B cutâneo primário centrofolicular
LCPZM	linfoma B cutâneo primário da zona marginal
LCPDGCB-TP	linfoma cutâneo primário difuso de grande célula B, tipo perna
LIM	laboratório de investigação médica
LNH	linfomas não Hodgkin
LT	linfócito T
MALT	<i>mucosa-associated lymphoid tissue</i>
MCED	morto com evidência de doença
MF	micose fungoide
NA	não avaliável
ng	nanograma
NGS	<i>next-generation sequencing</i>
nm	nanômetro
nt	nucleotídeo
NR	não realizado

p	braço curto do cromossomo
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PET-CT	tomografia computadorizada por emissão de pósitrons
PID	protocolo de investigação diagnóstica
PLC	pseudolinfoma cutâneo
PLCB	pseudolinfoma cutâneo de células B
PLCT	pseudolinfoma cutâneo de células T
PLPCB	processos linfoproliferativos cutâneos de células B
q	braço longo do cromossomo
rpm	rotação por minuto
Rx	radiografia
SALT	<i>skin-associated lymphoid tissue</i>
SED	sem evidência de doença
SOE	sem outra especificação
SS	síndrome de Sézary
TC	tomografia computadorizada
TCLE	termo de consentimento livre e esclarecido
TCR	<i>T-cell receptor</i>
TCR γ	<i>T-cell receptor gamma</i>
TNM	<i>Tumor Node Metastasis</i>
U	unidade
USCLC	<i>United States Cutaneous Lymphoma Consortium</i>
USG	ultrassonografia
UVA	ultravioleta A
UVB	ultravioleta B
V	região variável
VCED	vivo com evidência de doença
VSED	vivo sem evidência de doença
VZV	varicela zoster vírus
WHO	<i>World Health Organization</i>
x	vezes

μl	microlitro
μm	micrômetro
δ	delta
γ	gama
λ	lambda

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	22
2 OBJETIVOS.....	26
2.1 Objetivos primários:.....	26
2.2 Objetivos secundários:.....	26
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	27
3.1 Pseudolinfomas.....	27
3.1.1 Histórico e conceito.....	27
3.1.2 Aspectos epidemiológicos e etiologia.....	28
3.1.3 Aspectos classificatórios, manifestações clínicas e histopatologia.....	32
3.1.3.1 Pseudolinfoma nodular.....	37
3.1.3.1.1 Pseudolinfoma de células B nodular.....	37
3.1.3.1.2 Pseudolinfoma de células B nodular associado a Borrelia.....	38
3.1.3.1.3 Pseudolinfoma de células T nodular e pseudolinfoma misto nodular....	39
3.1.3.1.4 Pseudolinfoma de células T CD30 ⁺ nodular.....	40
3.1.3.2 Pseudolinfomas como simuladores de micose fungoide e outros LCCT.....	41
3.1.3.2.1 Dermatite de contato linfomatoide.....	42
3.1.3.2.2 Reação linfomatoide a drogas.....	42
3.1.3.2.3 Reticuloide actínico.....	43
3.1.3.2.4 Pseudolinfoma de células T CD8 ⁺ na imunodeficiência.....	44
3.1.3.2.5 Infecções simuladoras de linfomas de células T.....	45
3.1.3.2.6 Dermatoses inflamatórias simuladoras de linfomas cutâneos de células T.....	46
3.1.3.3 Outros Pseudolinfomas.....	46
3.1.3.3.1 Pseudolinfoma angiomatoide rico em células T.....	46
3.1.3.3.2 Plasmocitose cutânea.....	48
3.1.3.4 Pseudolinfoma intravascular.....	48
3.1.3.4.1 Linfoproliferação intravascular atípica benigna de células T CD30 ⁺	48
3.1.4 Métodos diagnósticos dos PLC.....	49
3.1.5 Tratamento dos PLC.....	50
3.2 Linfomas cutâneos primários de células B.....	53
3.2.1 Histórico e conceito.....	53
3.2.2 Aspectos epidemiológicos e etiologia.....	54
3.2.3 Aspectos classificatórios, manifestações clínicas e histopatologia.....	55
3.2.3.1 Linfoma B cutâneo primário centrofolicular.....	56
3.2.3.2 Linfoma B cutâneo primário da zona marginal.....	58
3.2.3.3 Linfoma cutâneo primário difuso de grande célula B, tipo perna.....	60
3.2.3.4 Linfoma intravascular de grande célula B.....	62
3.2.3.5 Úlcera mucocutânea EBV+.....	63
3.2.4 Métodos diagnósticos.....	63
3.2.5 Tratamento dos LCPCB.....	66
3.3 Pesquisa de clonalidade pelo rearranjo gênico da imunoglobulina e TCR.....	68
3.3.1 Receptores de células B e T.....	68
3.3.2 Rearranjo gênico do receptor de Ig e TCR.....	70

3.3.3 Pesquisa de clonalidade pela pesquisa de rearranjo gênico da Ig e TCR.....	71
4.CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	77
4.1 Casuística.....	77
4.2 Métodos.....	78
4.2.1. Avaliação de dados gerais e demográficos.....	78
4.2.2 Avaliação de dados clínico-evolutivos, histopatológicos, imuno-histoquímicos e de clonalidade.....	78
4.2.2.1 Avaliação clínica-evolutiva.....	79
4.2.2.2 Avaliação histopatológica e imuno-histoquímica.....	81
4.2.2.2.1 Revisão histopatológica.....	81
4.2.2.2.2 Revisão imuno-histoquímica.....	83
4.2.3 Pesquisa de clonalidade pela análise do rearranjo gênico da Ig e TCR γ	84
4.2.3.1 Extração do DNA.....	84
4.2.3.2 PCR Multiplex para análise de clonalidade em células B.....	85
4.2.3.3 PCR Multiplex para análise do rearranjo dos genes receptores TCR γ	86
4.2.3.4 Eletroforese capilar de fragmentos e sequenciamento.....	86
4.2.3.5 Avaliação da pesquisa de clonalidade pela análise do rearranjo gênico da Ig (PCR multiplex) e TCR γ	87
4.2.3.5.1 Avaliação da pesquisa de clonalidade pela análise do rearranjo gênico da imunoglobulina.....	87
4.2.3.5.2 Avaliação da pesquisa de clonalidade pela análise do rearranjo gênico da cadeia pesada da imunoglobulina (IgH).....	88
4.2.3.5.3 Avaliação da pesquisa de clonalidade pela análise do rearranjo gênico das cadeias leves da imunoglobulina (IgK e IgL).....	89
4.2.3.5.4 Avaliação final da pesquisa de clonalidade pela análise do rearranjo gênico da imunoglobulina.....	89
4.2.4 Proposição do protocolo de investigação diagnóstica de processos linfoproliferativos cutâneos de células B.....	90
4.2.5 Aspectos éticos e legais.....	91
4.2.6 Análise estatística.....	91
5 RESULTADOS.....	92
5.1 Resultados dos dados gerais e demográficos.....	92
5.2 Resultados dos dados clínico-evolutivos.....	96
5.3 Resultados da revisão histopatológica e estudo imuno-histoquímico.....	97
5.4 Resultados da pesquisa de clonalidade (estudo do rearranjo gênico da imunoglobulina e rearranjo gênico do TCR).....	99
5.4.1 Resultados da pesquisa de clonalidade pelo estudo do rearranjo gênico da imunoglobulina.....	99
5.4.1.1 Resultados de pesquisa de clonalidade do rearranjo gênico da cadeia pesada da imunoglobulina (IgH).....	99
5.4.1.2 Resultados de pesquisa de clonalidade do rearranjo gênico das cadeias leves de imunoglobulina (IgK e IgL).....	100
5.4.1.3 Resultados finais da clonalidade pela análise do rearranjo gênico das cadeias pesada e leves da imunoglobulina pelo PCR multiplex(BIOMED-2/Euroclonality).101	
5.4.2 Resultados da pesquisa de clonalidade pelo estudo do rearranjo gênico do TCR γ	102
5.5 Resultados dos critérios do protocolo de investigação diagnóstica.....	103

5.5.1 Resultados das frequências e porcentagens das pontuações referentes aos critérios avaliados no protocolo de investigação diagnóstica.....	103
5.5.2 Resultados da clonalidade B pela pesquisa do rearranjo gênico da imunoglobulina em relação aos subtipos histológicos pelos critérios histopatológicos associado a imuno-histoquímicos pelo protocolo proposto.....	103
5.5.3 Resultados finais dos critérios avaliados no protocolo de investigação diagnóstica proposto	104
5.5.4 Avaliação das associações entre os diferentes critérios do protocolo de investigação diagnóstica	104
5.5.5 Avaliação de sensibilidade e especificidade da pontuação final dos escores.....	107
5.5.6 Contribuição da pesquisa do rearranjo gênico da Ig para conclusão do diagnóstico final pelo protocolo de investigação diagnóstica proposto.....	108
6 DISCUSSÃO	111
7 CONCLUSÕES	118
REFERÊNCIAS	119
APÊNDICES	129
APÊNDICE A - Ficha de dados obtidos através de revisão de prontuário	130
APÊNDICE B - Critérios histopatológicos propostos de avaliação de processos linfoproliferativos cutâneos de células B no presente estudo.....	131
APÊNDICE C - Critérios imuno-histoquímicos propostos de avaliação de processos linfoproliferativos cutâneos de células B no presente estudo.....	133
APÊNDICE D - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	135
APÊNDICE E - Parecer consubstanciado do CEP	137
APÊNDICE F - Dados gerais e demográficos.....	138
APÊNDICE G - Quadros cutâneos dos pacientes estudados	140
APÊNDICE H - Resultados das escalas de pontuações dos critérios clínico-evolutivos do protocolo de investigação diagnóstica dos pacientes estudados de processos linfoproliferativos cutâneos B	143
APÊNDICE I - Resultados da revisão histopatológica	144
APÊNDICE J - Resultados da revisão imuno-histoquímica	146
APÊNDICE K - Resultados descritivos da pesquisa de clonalidade do rearranjo gênico da cadeia pesada da imunoglobulina (IgH) nos 35 casos avaliados de processos linfoproliferativos cutâneos B	148
APÊNDICE L - Resultados descritivos da pesquisa da clonalidade do rearranjo gênico das cadeias leves kappa e lambda da imunoglobulina (IgK e IgL) dos 35 casos avaliados de processos linfoproliferativos cutâneos B.....	149
APÊNDICE M - Resultados descritivos da pesquisa de rearranjo gênico de imunoglobulina por PCR dos 35 casos avaliados de processos linfoproliferativos cutâneos B.....	150
APÊNDICE N - Resultados descritivos da pesquisa da clonalidade do rearranjo gênico do TCR γ dos 35 casos estudados de processos linfoproliferativos cutâneos B.....	151
APÊNDICE O - Resultados das frequências e porcentagens das pontuações referentes aos critérios avaliados no protocolo de investigação diagnóstica.....	152
APÊNDICE P - Resultados da clonalidade B pela pesquisa do rearranjo gênico da imunoglobulina em relação aos resultados dos critérios histopatológicos associado a imuno-histoquímicos pelo protocolo proposto	154
APÊNDICE Q - Resultados das escalas de pontuações dos critérios avaliados no protocolo de investigação diagnóstica dos pacientes estudados de processos linfoproliferativos cutâneos B	160

APÊNDICE R - Resultados analíticos da contribuição dos resultados da pesquisa do rearranjo gênico da imunoglobulina em relação aos resultados da associação dos critérios clínico-evolutivos e histopatológicos associado a imuno-histoquímicos dos 35 pacientes avaliados na conclusão final do protocolo de investigação diagnóstica.....	161
APÊNDICE S - Resultados dos critérios do protocolo de investigação diagnóstica	162
APÊNDICE T - Eletroferogramas referentes aos resultados da pesquisa de rearranjo gênico da imunoglobulina	173
APÊNDICE U - Eletroferogramas referentes aos resultados da pesquisa de clonalidade T (TCR γ).....	216
ANEXOS	236
ANEXO A - Tabela original de interpretação de PCR multiplex de análise do rearranjo de imunoglobulina.....	237

1 INTRODUÇÃO

Processos linfoproliferativos cutâneos incluem pseudolinfomas (lesões benignas e reativas), proliferações linfoides atípicas (lesões *borderline* para alguns autores) e linfomas. Podem representar um continuum de lesões (pseudolinfomas cutâneos/condições reativas, proliferação linfoide atípica e linfomas) com potencial linfomatoso (Hussein, 2013b).

Pseudolinfoma cutâneo (PLC) refere-se a um grupo heterogêneo de processos linfoproliferativos benignos reativos de células T ou B de diversas causas que simulam linfomas cutâneos de forma clínica e/ou histológica (Ploysangam et al., 1998).

A maioria dos pseudolinfomas é idiopática, mas alguns podem ocorrer devido etiologias conhecidas como ingestão de drogas e picadas de artrópodes. Evoluem com resolução espontânea ou após tratamento local ou sistêmico, mas alguns casos podem apresentar recorrência (Hussein, 2013b). Representam um grupo heterogêneo de entidades, conhecidas por várias denominações ao longo da história, como “linfadenose benigna cutis”, sarcoide de Spiegler-Fendt, linfocitoma cutis, linfoplasia cutânea e hiperplasia linfoide cutânea (HLC) (Fernandez-Flores, 2013).

O PLC tem distribuição mundial e afeta todas as raças e grupos étnicos. Ocorre em adultos e crianças. As mulheres são mais comumente afetadas que os homens. As lesões ocorrem geralmente em face, mas o pescoço e dorso também podem estar envolvidos (Engin et al. 2014). Pacientes com PLC apresentam uma ampla variedade de apresentações clínicas e características histológicas que podem ser interpretadas erroneamente como linfomas cutâneos. A interpretação errônea de pseudolinfomas como linfomas pode resultar em tratamento desnecessário e prejudicial (Hussein, 2013b). Algumas evidências sugerem que os pseudolinfomas podem evoluir para linfoma cutâneo devido à estimulação antigênica persistente (Bergman, 2010). Os PLC são geralmente proliferações policlonais que regredem espontaneamente ou após o tratamento da etiologia de base (Hussein, 2013b). Raros casos apresentam populações linfoides clonais e podem progredir para linfomas de baixo grau (Sanguenza et al., 1992; Kulow et al., 2002).

Os linfomas representam grupos de desordens heterogêneas com características clinicopatológicas e moleculares relativamente bem definidas. São classificados em linfomas de Hodgkin e linfomas não-Hodgkin (Czuczman et al., 2010).

Uma variedade de neoplasias de células T e B podem acometer a pele, tanto primária quanto secundariamente. O termo “linfoma cutâneo primário” (LCP) refere-se a linfomas cutâneos primários de células T (LCPCT) e linfomas cutâneos primários de células B (LCPCB) que apresentam acometimento cutâneo sem evidência de doença extracutânea no momento do diagnóstico. Após o trato gastrointestinal, a pele é o segundo local mais comum de linfoma não-Hodgkin extranodal, com uma incidência anual estimada em 1:100.000 (Willemze et al., 2005).

Os LCPCB geralmente apresentam comportamento clínico e prognóstico completamente diferente dos linfomas sistêmicos, que podem envolver a pele secundariamente e, portanto, requerem diferentes tipos de tratamento. Por esta razão, sistemas de classificação recentes para linfomas não-Hodgkin, como a classificação da Organização Europeia para Pesquisa e Tratamento do Câncer (*European Organisation for Research and Treatment of Cancer* - EORTC) para linfomas cutâneos primários e a classificação da Organização Mundial de Saúde (*World Health Organization* - WHO) para tumores de tecidos hematopoiéticos e linfoides incluíram LCP como entidades separadas (Willemze et al., 2005).

O padrão ouro no diagnóstico de linfomas cutâneos é uma sólida correlação clínico-patológica (Deonizio e Guitart 2012). As características imunofenotípicas e a análise molecular (clonalidade) podem auxiliar na diferenciação dos PLC em relação aos linfomas. A associação de características clínicas, imuno-histoquímicas e moleculares, bem como dados de seguimento clínico, auxiliam no diagnóstico diferencial entre LCPCB e PLC (Hussein, 2013b).

A imunofenotipagem e estudo de clonalidade são relevantes por duas razões principais: (1) confirmar o diagnóstico nos casos em que as apresentações clínicas e / ou patológicas não são diagnósticas e (2) caracterizar melhor a natureza do linfoma. Os dados adicionais são importantes, pois um diagnóstico mais definido auxiliará os pacientes e seus familiares a enfrentar as consequências do diagnóstico de linfoma. Saber se o linfoma é primariamente cutâneo ou sistêmico, além da subclassificação do tumor permitirá ao clínico prosseguir com um plano de tratamento mais apropriado (Deonizio e Guitart, 2012).

Embora a neoplasia possa ser precedida pela expansão oligoclonal de células pré-malignas, ultimamente, é mais bem definida pelo crescimento de células derivadas de uma única célula ou de uma expansão clonal. A detecção de uma população monoclonal pode auxiliar na diferenciação entre linfoma e um processo reacional. No entanto, a clonalidade isolada não implica em malignidade e, da mesma forma, um resultado negativo de clonalidade não implica necessariamente em processo benigno. Na exposição às células apresentadoras de antígenos, os linfócitos são preparados para agir contra epítomos específicos. Durante este processo, os genes que codificam a imunoglobulina (Ig) do receptor de antígenos para células B e os genes do receptor de células T (*T-cell receptor* - TCR) para células T são rearranjados (Deonizio e Guitart, 2012).

O diagnóstico de linfoma cutâneo na ausência de envolvimento sistêmico pode ser difícil. A análise molecular dos rearranjos gênicos provou ser uma técnica sensível na detecção de populações clonais de linfócitos (Landa et al., 1993). Nas últimas duas décadas, a análise baseada na reação em cadeia da polimerase (*Polymerase chain reaction* - PCR) dos rearranjos de Ig/TCR substituíram gradualmente a análise de Southern blot como método padrão ouro para testes de clonalidade (Langerak et al., 2012). Nos últimos anos, foi apresentada uma nova abordagem de análise dos rearranjos de IgH e IgK através do sequenciamento de próxima geração (*Next-generation sequencing* - NGS) (Scheijen et al. 2019).

Em um estudo colaborativo europeu (EuroClonality/ BIOMED-2), os ensaios de PCR multiplex foram desenvolvidos com sucesso e padronizados para a detecção da clonalidade pelo rearranjo de genes de Ig e TCR. Na maioria dos pacientes com distúrbios linfoproliferativos suspeitos, histomorfologia ou citomorfologia suplementada com imunohistologia ou imunofenotipagem por citometria de fluxo podem discriminar entre linfoproliferações malignas e reativas. O diagnóstico de doenças malignas linfoides pode ser apoiado pela avaliação da clonalidade com base no fato de que, em princípio, todas as células malignas têm origem clonal comum (van Dongen et al., 2003).

A proliferação de anticorpos monoclonais utilizados em cortes de parafina como marcadores linfocitários, o desenvolvimento de meios moleculares para determinar a clonalidade em distúrbios linfoproliferativos e o avanço nos sistemas de classificação para linfomas cutâneos, melhoraram a capacidade de diferenciar PLC de LCP. Apesar do

progresso notável que foi feito, nenhum dos critérios clínicos, histológicos, imuno-histoquímicos e moleculares atuais são absolutamente diagnósticos em PLC (Bergman, 2010). Mas sim, o diagnóstico é fundamentado em uma constelação de achados clínicos, exclusão de linfomas cutâneos e outros possíveis etiologias que resultam no diagnóstico de PLC (Ayoubi et al., 2020). Mesmo assim, uma porcentagem substancial de casos suspeitos de PLC permanecem indefinidos, uma vez que a diferenciação de linfoma cutâneo pode ser muito difícil (Bergman, 2010).

No presente estudo objetivou-se a análise da clonalidade do rearranjo gênico através da pesquisa das cadeias pesada (IgH) e leves (IgK e IgL) de Ig na contribuição da pesquisa diagnóstica e diferenciação entre os linfomas e pseudolinfomas. Também a proposição de um protocolo de investigação para a conclusão diagnóstica final em processos linfoproliferativos cutâneos de células B (PLPCB).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos primários:

- a) aplicar e avaliar a utilidade da pesquisa de clonalidade através do rearranjo gênico das cadeias pesada e leves de Ig em material proveniente de biópsias cutâneas no auxílio diagnóstico de PLPCB (PLC, LCPCB e casos com indefinição diagnóstica) de pacientes acompanhados no Ambulatório de Linfomas Cutâneos da Divisão de Clínica Dermatológica do HCFMUSP;

2.2 Objetivos secundários:

- a) avaliar a funcionalidade da reação em cadeia de polimerase pelo protocolo BIOMED-2/Euroclonality em amostras fixadas em formol e incluídas em parafina e/ou congeladas;
- b) propor um protocolo de investigação diagnóstica para PLPCB baseado em critérios clínico-evolutivos, na avaliação histopatológica e imunohistoquímica e na pesquisa de clonalidade de células B;
- c) identificar a contribuição do protocolo proposto e proposição de um algoritmo para a conclusão diagnóstica final e conduta de casos de PLPCB com dificuldade diagnóstica.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Pseudolinfomas

3.1.1 Histórico e conceito

O termo pseudolinfoma cutâneo (PLC) é dado a um grupo de desordens com infiltração linfocítica que se assemelham de forma histológica ao linfoma cutâneo (Arai et al., 2005).

O conceito de PLC vem evoluindo há quase um século. Vários termos foram usados para rotular essas lesões. Foi em 1890 que Kaposi pela primeira vez usou o termo “sarcomatosis cutis” para denotar lesões benignas que simulavam sarcomas. Mais tarde, Spiegler e Fendt usaram o termo sarcoide (Hussein, 2013b). Em 1923, Biberstein cunhou o termo linfocitoma cútis (LC). Posteriormente, o termo linfadenose benigna cútis foi introduzido por Bafverstedt em 1943. Em 1967, Lever introduziu o termo pseudolinfoma de Spiegler e Fendt. Posteriormente, Caro e Helwig, em 1969, introduziram o termo hiperplasia linfoide cutânea (Ploysangam et al., 1998). Outros termos usados para denominar os PLC são: linfoplasia cutânea, pré-lymfomas e hamartoma linfoide (Hussein, 2013b). A denominação HLC parece melhor descrever o curso clínico benigno (Miguel et al., 2018).

Pseudolinfomas ocorrem com mais frequência na pele, mas foram descritos em outros órgãos, como o olho, língua, glândula parótida, laringe, trato gastrointestinal, pulmão, rim, mama (Miguel et al., 2018) e fígado (Kwon et al., 2015). Dependendo do tipo de célula predominante no infiltrado cutâneo, assim como nos linfomas, os PLC são geralmente divididos em pseudolinfoma cutâneo de células B (PLCB) e pseudolinfoma cutâneo de células T (PLCT). Em retrospecto, a maioria dos termos como LC, linfadenose benigna cútis, pseudolinfoma de Spiegler e Fendt e HLC foram concebidos para descrever PLCB. Embora o reticuloide actínico tenha sido descrito pela primeira vez em 1969, o conceito de PLCT não foi amplamente aceito até o início dos anos 80 (Ploysangam et al., 1998).

A diferenciação clássica entre lesão benigna e neoplasia é baseada na combinação de achados histopatológicos e o comportamento final (metástase). Embora se tenha uma

definição final baseada no comportamento biológico da neoplasia, na rotina médica utiliza-se principalmente a interpretação dos achados histológicos pelo patologista para determinar se uma lesão é benigna ou maligna. Vários achados histológicos (por exemplo, características arquiteturais, pleomorfismo, hipercromasia e mitoses) são analisados para indicar o diagnóstico de malignidade. Embora estes achados auxiliem a diferenciar lesões benignas de malignas na maioria dos casos, algumas lesões podem ter características histológicas sugestivas de malignidades ainda que um comportamento biologicamente benigno que dificulta a definição diagnóstica final (Ploysangam et al., 1998).

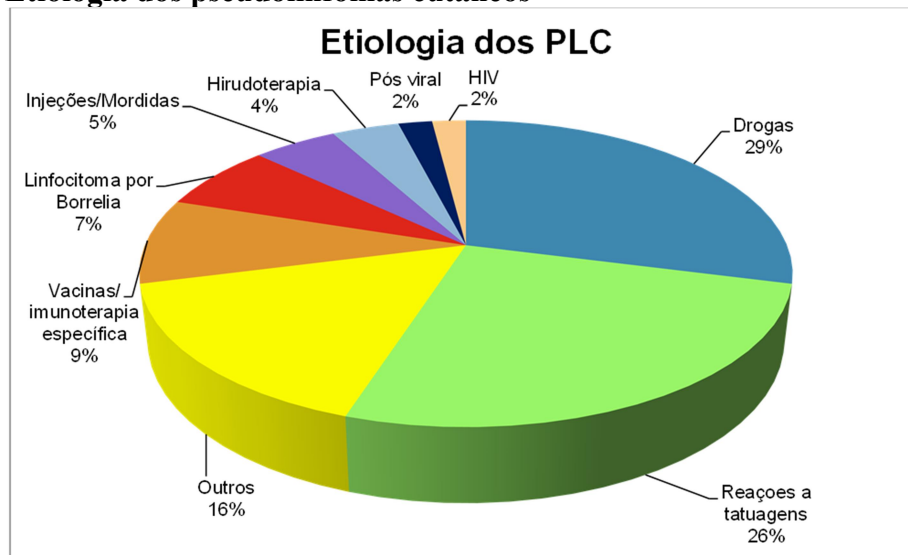
Existe confusão em relação ao conceito de pseudolinfoma. A definição estrita de pseudolinfoma é um processo que simula o linfoma, principalmente histologicamente, mas às vezes clinicamente, que no momento do diagnóstico parece ter um comportamento biológico benigno e não satisfaz os critérios para o linfoma maligno. O termo pseudolinfoma não se refere a uma doença específica, nem esclarece sobre a causa, mas implica simplesmente em um processo de acúmulo de linfócitos na pele em resposta a uma variedade de estímulos conhecidos e desconhecidos (Ploysangam et al., 1998). É um termo descritivo que engloba várias condições reativas com etiologia, patogênese, apresentação clínica, histologia e comportamento variados (Romero-Pérez et al., 2016). O termo carece de especificidade e deve ser usado somente quando as causas e / ou mecanismos para a proliferação linfocitária não forem identificados. Sempre que possível, termos mais específicos que impliquem a causa da hiperplasia linfocitária devem ser utilizados (Ploysangam et al., 1998).

3.1.2 Aspectos epidemiológicos e etiologia

O PLC tem distribuição mundial e afeta todas as raças e grupos étnicos. Ocorre em adultos e crianças. As mulheres são mais comumente afetadas que os homens (Engin et al., 2014). Dados epidemiológicos sobre PLC são escassos, porém os PLCB parecem ser mais comuns do que PLCT (Romero-Pérez et al., 2016). Não há dados disponíveis sobre a incidência global e prevalência de PLCT. O PLCB desenvolve principalmente no início da vida adulta, embora possa ocorrer em qualquer idade, com a idade mediana de 34 anos. Aproximadamente dois terços dos pacientes com PLCB apresentam-se com idade inferior a 40 anos na biópsia inicial. Nenhum caso familiar foi relatado (Ploysangam et al., 1998).

PLC é um processo linfoproliferativo de células T ou B policlonal reativo que pode ser localizado ou disseminado na pele (Miguel et al., 2018). A maioria dos PLC é idiopática, mas alguns são secundários a etiologias conhecidas (Hussein, 2013b). Miguel et al. resumiram a frequência das diferentes causas de PLC (Miguel et al., 2018) conforme detalhado na Figura 1 (Mitteldorf e Kempf, 2020). Algumas lesões estão associadas à exposição antigênica de artrópodes (mordidas, picadas e infestações), infecções (por exemplo *Borrelia burgdorferi*), injeções de hipossensibilização ou medicamentos (Engin et al., 2014). Respostas reativas que podem resultar em PLC incluem respostas a dermatite de contato, dermatose purpúrica pigmentada liquenoide, líquen escleroso e atrófico, estágio inflamatório da morfeia, sífilis secundária, paniculite lúpica, reações de artrópodes, escabiose nodular, infecções virais como orf, nódulo de ordenhador, herpes simplex/ zoster e molusco contagioso), tintas de tatuagem, vacinas, traumas, joias para perfuração de orelhas, como ouro, acupuntura, hirudoterapia, leishmaniose e reações a drogas (Miguel et al., 2018). A identificação do agente etiológico e acompanhamento prolongado são consideradas etapas importantes para averiguar a natureza reativa benigna dos PLC (Hussein, 2013b).

Figura 1 - Etiologia dos pseudolinfomas cutâneos



FONTE: modificado de Miguel et al., 2018.

Frequência das diferentes causas de pseudolinfomas cutâneos.

Medicamentos que podem causar PLC incluem anticonvulsivantes, antipsicóticos, anti-hipertensivos, citotóxicos, antirreumáticos, antibióticos, ansiolíticos, anti-histamínicos, antiarrítmicos, esteroides sexuais, agentes hipolipemiantes e, mais recentemente, agentes anti-

fator de necrose tumoral alfa, tocilizumabe e ciclosporina (Miguel et al., 2018), conforme detalhado na Tabela 1.

Tabela 1 - Principais drogas desencadeadoras de pseudolinfomas

Classe	Drogas
Anticonvulsivantes	Fenitoína, carbamazepina, mefenitoína, trimetadiona, fenobarbital, primidona, butabarbital, mesuximida, fensuximida
Antipsicóticos	Clorpromazina, tioridazina, prometazina, metilfenidato
Anti-hipertensivos	
Inibidores da enzima de conversão da angiotensina	Captopril, enalapril, benazepril
Beta-Bloqueadores	Atenolol, labetalol
Bloqueadores dos canais de cálcio	Verapamil, diltiazem
Diuréticos	Hidroclorotiazida, amirolida
Citotóxicos	Ciclosporina, metotrexato
Antirreumáticos	Ouro, salicilatos, fenacetina, D-penicilamina, alopurinol, antiinflamatórios não esteroidais
Antibióticos	Penicilina, dapsona, nitrofurantoína, vancomicina
Antidepressivos	Fluoxetina, doxepina, desipramina amitriptilina, lítio
Ansiolíticos	Benzodiazepínicos (clonazepam, lorazepam)
Anti-histamínicos	Difenidramina
Antagonistas de receptores H2	Cimetidina, ranitidina
Antiarrítmicos	Cloreto de mexiletina, procainamida
Agentes tópicos	Mentol, eugenol
Esteroides sexuais	Estrogênio, progesterona
Agentes hipolipemiantes	Lovastatina
Biológicos	Adalimumabe, infliximabe, etanercept
Outros	Lornoxicam, ácido zoledrônico

FONTE: Engin et al., 2014. Romero-Pérez et al., 2016.

As terapias alvo com agentes biológicos têm se tornando cada vez mais rotineiras no tratamento de vários distúrbios inflamatórios e neoplásicos com relatos de casos de PLC associado à terapia com biológicos (Magro et al., 2018). Em 2014, Safa et al. relataram um paciente que desenvolveu eritrodermia em associação ao uso de infliximabe para doença de Crohn refratária com manifestações clínicas de eritrodermia pruriginosa, queratodermia palmo plantar e linfadenopatia generalizada. Tanto biópsia de pele quanto linfonodo demonstraram uma predominância de infiltrado de células T CD8⁺ (Safa et al., 2014). Em 2016, Carvalhana relatou o desenvolvimento de PLC após 4 anos do início de infliximabe

para a doença de Crohn (Carvalhana et al., 2016). Em 2020, Ayoubi et al. relataram o diagnóstico de pseudolinfoma induzido por ipilimumabe/nivolumabe em um paciente com melanoma metastático (Ayoubi et al., 2020).

A pele é um órgão dos sistemas imunológico e linfoide. O tecido linfoide associado à pele (*skin-associated lymphoid tissue* - SALT) análogo ao tecido linfoide associado à mucosa (*mucosa-associated lymphoid tissue* - MALT) prolifera na pele em resposta à estimulação antigênica. Praticamente todos os linfócitos do SALT são células T, enquanto as células B estão quase ausentes. O SALT apresenta todos os tipos celulares necessários para iniciar uma resposta imune e, assim, funciona como um tecido linfoide periférico que pode regular a imunidade da pele. A resposta à estimulação antigênica persistente ocorre por expansão de linfócitos T e células apresentadoras de antígenos. Hussein considera PLC como proliferações inflamatórias e reativas do SALT após estimulação antigênica das células do sistema imune da pele. A diversidade morfológica do PLC reflete a exposição a uma enorme quantidade de antígenos com diferentes respostas a diferentes epítopos. Alguns antígenos podem estimular as células B, outros podem estimular as células T e ainda existem antígenos que podem estimular as células B e T (Hussein, 2013b).

Os PLC são geralmente proliferações policlonais que regridem espontaneamente ou após o tratamento da etiologia subjacente (Hussein, 2013b). Raros casos abrigam populações linfoides clonais e podem progredir para linfomas de baixo grau (Kulow et al., 2002). Kulow et al. revisaram retrospectivamente quatro pacientes com diagnóstico inicial de PLCB. Os pacientes tiveram um curso clínico progressivo ao longo de um intervalo de 17–51 meses e desenvolveram linfomas cutâneos de células B (Hussein, 2013b). A confusão em relação à nosologia do PLC e sua relação com outros distúrbios linfoproliferativos surgem devido a esta observação de que alguns pacientes com pseudolinfoma eventualmente progrediram para linfoma (Ploysangam et al., 1998). Em muitos desses casos, o estudo inicial de rearranjo de gene demonstrou presença de bandas clonais. Ainda não está claro se esses pacientes apresentavam linfomas que inicialmente tiveram diagnóstico histológico errôneo de PLC devido à falta de critérios suficientes, ou se a presença inicial de clones de linfócitos em PLC foi uma etapa inicial de progressão para linfoma cutâneo. A estimulação antigênica persistente foi sugerida como causa para esta ocorrência (Tian et al., 2019). O principal modelo de progressão de hiperplasia linfoide em linfoma por estimulação antigênica

persistente seria o linfoma de tecido linfático associado à mucosa gástrica, que acredita ser induzido pela infecção persistente por *Helicobacter pylori* (Bergman, 2010).

A proliferação linfoide atípica cutânea é um termo descritivo usado quando não é possível ao patologista diferenciar entre a natureza benigna e maligna de um determinado infiltrado linfoide. Essas lesões linfoproliferativas atípicas representam condições biologicamente indeterminadas que têm algumas características clinicopatológicas preocupantes, mas não podem ser interpretadas como linfomas usando todos os critérios atualmente disponíveis. Possuem alguma probabilidade de progressão para linfomas (Hussein, 2013b). Quando confrontado com uma lesão linfoproliferativa cutânea, o patologista deve usar todos os recursos para interpretá-la da forma mais precisa possível e, portanto, categorizá-la em uma das duas categorias: condição inequivocamente benigna (pseudolinfoma cutâneo/reactivo) ou linfomas. Os recursos incluem estudos imuno-histoquímicos e moleculares, obtenção de opinião de especialista e nova biópsia (Hussein, 2013a). A combinação de critérios histológicos, imunofenotípicos e estudos de rearranjo gênico, juntamente com o quadro clínico, continuam sendo a melhor maneira de avaliar a agressividade de uma determinada lesão linfoproliferativa (Hussein, 2013b).

3.1.3 Aspectos classificatórios, manifestações clínicas e histopatologia

A apresentação clínica do PLC abrange amplo espectro de nódulo solitário ou agrupado, pápulas disseminadas até eritrodermia (Mitteldorf e Kempf, 2017). Os PLC geralmente envolvem as áreas expostas, como região da cabeça e pescoço e extremidades superiores (Hussein, 2013b). Algumas lesões mostram regressão após a biópsia, mas muitos persistem por vários meses ou mesmo anos. Recorrências podem ser observadas particularmente após a reexposição ao agente indutor em casos induzidos por drogas ou alérgenos. Se um agente causador foi identificado, deve ser removido, sempre que possível (Mitteldorf e Kempf, 2017).

Os PLC abrangem condições cutâneas reativas com diferentes etiologias, patogênese e apresentações clinicopatológicas (Bergman et al., 2011). Em contraste com os linfomas cutâneos, existem apenas algumas propostas de classificações de PLC que não são consensuais (Mitteldorf e Kempf, 2020). Os PLC são tradicionalmente divididos em PLCT e

PLCB (Tabela 2) conforme o predomínio de linfócitos no infiltrado (Ploysangam et al., 1998), embora em muitas condições essa distinção seja artificial. Por exemplo, PLC induzidos por drogas podem apresentar tanto padrão de células T quanto de células B e a mesma droga pode induzir padrões diferentes em pacientes diferentes (Cerroni, 2020).

Tabela 2 - Classificação dos pseudolinfomas cutâneos conforme predomínio do infiltrado linfocitário

Grupos principais	Subtipos
Pseudolinfomas cutâneos de células T (padrão em faixa)	<ul style="list-style-type: none"> - PLCT idiopático - Erupção linfomatoide a drogas (maioria dos casos) - Dermatite de contato linfomatoide - Escabiose nodular (poucos casos) - Reticuloide actínico - Papulose linfomatoide (tipo B) - PLCT clonal
Pseudolinfomas cutâneos de células T (padrão nodular)	<ul style="list-style-type: none"> - Síndrome de pseudolinfoma induzido por anticonvulsivante (poucos casos) - Reação nodular persistente a picada de artrópodes (maioria dos casos) - Escabiose nodular (maioria dos casos) - Angioqueratoma pseudolinfomatoso acral (maioria dos casos) - Papulose linfomatoide (tipo A)
Pseudolinfomas cutâneos de células B (padrão nodular)	<ul style="list-style-type: none"> - Linfocitoma cútis idiopático - Linfocitoma cútis pela Borrelia - Linfocitoma cútis induzido por tatuagem - Linfocitoma cútis em cicatriz pós herpes zoster - Linfocitoma cútis causado por injeção de antígeno/acupuntura - Reação nodular persistente a picada de artrópodes (poucos casos) - Erupção linfomatoide a drogas (poucos casos) - Angioqueratoma pseudolinfomatoso acral (poucos casos) - PLCB clonal

FONTE: Ploysangam et al.,1998.

Outra proposta de classificação dos PLC é relacionada à associação de entidades clínico-patológicas específicas (Tabela 3) (Cerroni, 2020). Houve aumento dos PLC nos últimos anos com a inclusão de várias condições reativas com características histopatológicas que simulam linfomas verdadeiros (Romero-Pérez et al., 2016). Mas é relevante salientar que alguns dos casos publicados representam entidades reativas que, em raras exceções, podem simular histopatologicamente um linfoma cutâneo. Assim tais condições não representam em geral um pseudolinfoma, mas podem simular um linfoma em casos excepcionais (Cerroni, 2020).

Tabela 3 - Classificação dos pseudolinfomas cutâneos conforme associação com entidades clínico-patológicas

Entidade clínico-patológica	Linfoma simulado
Dermatite actínica crônica (reticuloide actínico) Dermatite de contato linfomatoide Mucinosose folicular não associada a MF e outros infiltrados foliculotrópicos benignos Ceratose ('linfomatoide') liquenoide (incluindo pseudolinfoma de células B / T idiopático solitário) Líquen aureus/dermatite purpúrica pigmentada liquenoide Líquen escleroso Vitiligo (estágio inflamatório) Dermatite anular liquenoide juvenil Acrodermatite crônica atrófica pseudolinfomatosa (variante superficial) Dermatite atópica pseudolinfomatosa Eritrodermia não neoplásica em pacientes adultos Infiltrados cutâneos superficiais CD8 ⁺ em pacientes infectados com HIV ou em outras deficiências imunológicas Reação medicamentosa linfomatoide, tipo liquenoide Pseudolinfomas em tatuagens, tipo liquenoide Pseudolinfomas após vacinação, tipo liquenoide Sífilis secundária (variante superficial) Pitiríase liquenoide Lúpus eritematoso (variante superficial) Infiltrados pseudolinfomatosos ocasionais em outros distúrbios inflamatórios (por exemplo, líquen plano, psoríase, penfigoide bolhoso, etc.)	Micose fungoide/Síndrome de Sézary
Pseudolinfoma em infecções por herpes simplex ou herpes zoster Pitiríase liquenoide, incluindo a variante ulceronecrótica Lúpus eritematoso, variante angiocêntrica Sífilis secundária, pobre em plasmócitos	Linfoma citotóxico de células T/NK ou papulose linfomatoide/ linfoma anaplásico de grandes células cutâneo
Infiltrados linfoides atípicos (CD30 ⁺) associados a orf, nódulo de ordenhador, molusco contagioso, e outras distúrbios infecciosas ou não infecciosas Reações persistentes de picaduras de artrópodes (incluindo escabiose nodular) Sífilis primária	Papulose linfomatoide/ linfoma anaplásico de grandes células cutâneo
Paniculite lúpica Paniculite lipoatrófica dos tornozelos Paniculite lobular em crianças com deficiências imunológicas congênitas	Linfoma subcutâneo de células T paniculite-símile
Angioqueratoma pseudolinfomatoso acral de crianças (APACHE) Pseudolinfoma polipoide angiomatoide rico em células T Placa linfoplasmocítica pré-tibial em crianças (Pseudolinfoma angiomatoide rico em células B/T)	Distúrbio linfoproliferativo cutâneo de células T CD4 ⁺ pequenas/médias ou linfoma da zona marginal
Infiltrados cutâneos nodulares pseudolinfomatosos em deficiências imunológicas congênitas Pseudolinfoma em tatuagem (variante nodular rica em células T) Hidroa vaciniforme convencional	Linfoma hidroa vaciniforme -símile

(continua)

Entidade clínico-patológica	Linfoma simulado
(continuação)	
Linfocitoma cútis (associado a <i>Borrelia</i>)	Linfoma centrofolicular ou linfoma difuso de grande célula B
Linfocitoma cútis devido a várias causas (não associado a <i>Borrelia</i>)	
Pseudolinfoma após vacinação, de células B	
Reação linfomatoide a medicamento, de células B	
Granuloma plasmocítico cutâneo	Linfoma de zona marginal
Pseudolinfoma em tatuagens, de células B	
Acrodermatite crônica atrófica pseudolinfomatosa, tipo plasmocítico nodular	
Erupção por droga pseudolinfomatosa com população proeminente de plasmócitos	
Sífilis secundária (tipo nodular rico em plasmócitos)	
Esclerodermia/morfeia localizada, estágio inflamatório	
Plasmocitose cutânea e sistêmica	
Manifestações cutâneas da doença de Castleman	Manifestações cutâneas de leucemia linfocítica crônica de células B
Lúpus tímido/infiltração linfocítica da pele (Jessner – Kanof)	
Hematopoiese cutânea extramedular	Manifestações cutâneas de leucemia mieloide
Síndrome de Sweet histiocitoide	
Histiocitose intralinfática	Linfoma intravascular difuso de grandes células, linfoma anaplásico de grandes células intralinfático ou papulose linfomatoide intralinfático
Proliferação intralinfática benigna de blastos linfoides de células T	

FONTE: Skin lymphoma: the illustrated guide, 5ª edição, 2020.

Nenhuma das propostas prévias de classificação considera possibilidade de sobreposição das características. Além disso, o fenótipo e a etiologia não são evidentes à primeira vista; sendo necessária investigação diagnóstica complementar. A composição do infiltrado é variável, sendo influenciada pela genética e fatores imunológicos do hospedeiro, conforme observação de que o mesmo agente (por exemplo, *Borrelia sp.*) podem induzir tanto PLCB quanto PLCT. Recentemente, foi sugerida uma classificação de PCL em quatro grupos principais baseada nas características histopatológicas e clínicas (Mitteldorf e Kempf, 2020), detalhadas a seguir (Tabela 4) :

- a) pseudolinfoma nodular: representa o PLC mais comum (“PLC clássico”). Simulam LCPCB ou LCPCT tanto clínica quanto histopatologicamente, e são caracterizado por nódulos solitários ou múltiplos;

- b) pseudolinfomas como simuladores de micose fungoide (MF) e outros LCCT: simulam MF ou outros LCCT, principalmente em achados histopatológicos e apresentam amplo espectro clínico;
- c) outros pseudolinfomas: entidades clínicas distintas relatadas na literatura como PLC;
- d) pseudolinfoma intravascular: acúmulo de linfócitos reativos com aparência atípica no interior de pequenos vasos linfáticos.

Tabela 4 - Classificação de pseudolinfomas cutâneos baseada em características clínicas e histopatológicas

Grupos principais	Subtipos
Pseudolinfoma nodular	<ul style="list-style-type: none"> - Pseudolinfoma de células B nodular - Pseudolinfoma de células B nodular associado a <i>Borrelia</i> - Pseudolinfoma de células T e misto nodular - Pseudolinfoma de células T nodular CD30⁺
Pseudolinfomas simuladores de micose fungoide ou de outros linfomas cutâneos de células T	<ul style="list-style-type: none"> - Dermatite de contato linfomatoide - Reação linfomatoide a drogas - Reticuloide actínico - Pseudolinfoma de células T CD8⁺ na imunodeficiência - Infecções simuladoras de linfomas de células T: <ul style="list-style-type: none"> Pseudolinfoma de células T associado a <i>Borrelia</i> Pseudolinfoma de células T associado à leishmaniose^a Pseudolinfoma de células T associado ao herpes vírus Pseudolinfoma associado à sífilis - Outras infecções simuladoras de linfomas cutâneos de células T - Dermatoses inflamatórias simuladoras de linfomas cutâneos de células T
Outros pseudolinfomas	<ul style="list-style-type: none"> - Pseudolinfoma angiomatoide rico em células T: <ul style="list-style-type: none"> Angioqueratoma pseudolinfomatoso acral Pseudolinfoma polipoide angiomatoide rico em células T Hiperplasia cutânea primária angioplasmocelular Placa linfoplasmocítica - Plasmocitose cutânea
Pseudolinfomas intravasculares	Linfoproliferação intravascular atípica benigna (CD30 ⁺)

^aTambém ocorre como pseudolinfoma de células T nodular.

FONTE : Mitteldorf & Kempf, 2020.

3.1.3.1 Pseudolinfoma nodular

3.1.3.1.1 Pseudolinfoma de células B nodular

O PLC nodular representa uma das formas mais comuns de PLC. Pode ser classificado de acordo com o infiltrado linfocítico predominante em PLCB (predomínio de linfócitos B), PLCT (predomínio de linfócitos T) e misto (presença de de linfócitos B e T). PLCB é frequentemente também referido como LC ou HLC. PLCB nodular se apresenta na maioria dos casos como nódulo solitário avermelhado, violáceo ou acastanhado, medindo até 4 cm. Às vezes, alguns nódulos são agrupados. Cerca de 10% a 15% dos pacientes desenvolvem pápulas e nódulos disseminados (forma disseminada) (van Vloten e Willemze, 2003).

Uma forma miliária-símile, com múltiplas pápulas de alguns milímetros de diâmetro, também foi relatada. Representa uma entidade rara com menos de 50 casos relatados no mundo. Mulheres de meia-idade são mais comumente afetadas. Manifesta-se como erupção cutânea assintomática ou levemente pruriginosa caracterizada por numerosas pápulas monomórficas translúcidas de 1 a 2 mm geralmente localizadas na face ou pescoço em um padrão simétrico. Em casos raros, pequenas pápulas podem ser acompanhadas de nódulos (Moulonguet et al., 2012).

PLCB nodular é caracterizado por infiltrados linfocíticos densos, predominantemente intradérmicos (nodulares ou difusos). Estende-se ao tecido subcutâneo em alguns casos. Em geral, o infiltrado consiste em linfócitos B de tamanho pequeno a médio, sem atipia nuclear. Centros germinativos reativos são comumente encontrados e frequentemente contêm macrófagos com corpos tingíveis. Em muitos casos, o infiltrado apresenta plasmócitos, eosinófilos e/ ou histiócitos. A presença de linfócitos T é variável, mas geralmente não excede 30% de todo o infiltrado. O infiltrado consiste predominantemente em linfócitos B que expressam marcadores típicos de células B, como CD19, CD20, CD79a e PAX-5. Os centros germinativos reativos expressam BCL-6 e são negativos para BCL-2. As redes de células dendríticas foliculares (CDF) podem ser destacadas pela marcação de CD21, e geralmente são nitidamente demarcadas. Isto é um achado importante para determinar os centros germinativos como reativos. O índice proliferativo (Ki-67) é elevado, especialmente no centro germinativo. As células B interfoliculares expressam BCL-2 e são negativas para BCL-6

(Mitteldorf e Kempf, 2020). Com algumas exceções, não é encontrado rearranjo monoclonal dos genes da cadeia pesada de Ig. A pesquisa da expressão de cadeias leves kappa (K) e lambda (L) de Ig por plasmócitos é realizada através de estudo imuno-histoquímico ou hibridização *in situ* (Mitteldorf e Kempf, 2017). A presença de expressão monotípica de cadeias leves é considerado nas razões K/L de mais do que 10: 1 ou menos do que 0,5: 1 (Ploysangam et al., 1998). A variabilidade da proporção reflete as diferenças nas proporções normais para K e L; K geralmente predomina de 2 a 4 x, enquanto L é normalmente de metade a um quarto dos plasmócitos kappa-positivos. Os diagnósticos diferenciais mais importantes são LCPB indolentes (especialmente LCPZM e LCPCF) e linfomas cutâneos secundários de células B (Mitteldorf e Kempf, 2020).

3.1.3.1.2 *Pseudolinfoma de células B nodular associado a Borrelia*

PLCB nodular associado a *Borrelia* é frequentemente referido pelos sinônimos LC associado a *Borrelia* (Ploysangam et al., 1998) e linfadenose cútis benigna (Mitteldorf e Kempf, 2017). É uma manifestação rara da infecção por *B. burgdorferi* (Ploysangam et al., 1998) e corresponde a cerca de 1% das infecções clínicas aparentes. Este diagnóstico pode ser feito através de uma combinação de histopatologia e detecção de DNA de *B. burgdorferi* no tecido por PCR. O contexto clínico (história de picada de carrapato, acometimento dos locais de predileção e sorologia) é também útil (Mitteldorf e Kempf, 2020). Ocorre mais comumente em áreas endêmicas para o carrapato *Ixodes ricinus* na Europa e é raro na América do Norte (Ploysangam et al., 1998; Engin et al., 2014). Parece ser mais comum em crianças do que em adultos. Clinicamente, apresenta-se como nódulo solitário eritematovioláceo localizado nos lóbulos das orelhas, mamilos e escroto de caucasianos; uma razão para estes sítios de predileções pode ser a temperatura corporal mais baixa nessas áreas. Cerca de 10% a 15% dos casos exibem lesões cutâneas multifocais. O tronco e as extremidades também podem estar envolvidos (Colli et al., 2004).

Na histopatologia ocorre infiltrado dérmico ou subcutâneo de linfócitos B associado com grandes centros germinativos confluentes com zonas do manto pequenas ou mesmo ausentes. A falta de polarização é encontrada em até 20% em alguns casos. Por causa da confluência dos grandes centros germinativos pode ocorrer muitas características de

sobreposição com LCPCF com padrão de crescimento folicular (Boudova et al., 2005). Achados imuno-histoquímicos são idênticos aos descritos em PLCB nodular clássico (Mitteldorf e Kempf, 2020).

3.1.3.1.3 *Pseudolinfoma de células T nodular e pseudolinfoma misto nodular*

PLCT nodular é definido como um infiltrado predominante de linfócitos T. Nos quadros de pseudolinfoma misto nodular são encontradas a mesma proporção de linfócitos T e B. PLCT nodular e pseudolinfoma misto nodular geralmente ocorrem como nódulos eritematosos ou violáceos solitários ou múltiplos semelhantes ao PLCB nodular. É uma questão controversa se o PLCT nodular corresponderia ao quadro idêntico da desordem linfoproliferativa de células T CD4⁺ pequenas/médias que se apresenta na maioria dos casos como placa ou nódulo solitário, predominantemente localizado na cabeça e pescoço (Mitteldorf e Kempf, 2020). Não existem dados epidemiológicos detalhados sobre a prevalência de PLCT nodular ou pseudolinfoma misto nodular. Afetam pacientes de ambos os sexos, todas as idades e grupos étnicos (Mitteldorf e Kempf, 2017).

No PLCT nodular e PLC misto nodular ocorre infiltrado linfocítico nodular ou difuso que acomete a derme e às vezes também o tecido subcutâneo superficial. Os linfócitos são predominantemente pequenos e evidenciam núcleos de cromatina densa. O número de eosinófilos, plasmócitos, histiócitos e linfócitos B associados é variável. Raramente observa-se a formação de granuloma e centros germinativos. Em alguns casos ocorre invasão de linfócitos T na epiderme e no epitélio dos folículos capilares. A maioria dos linfócitos expressa CD3, CD4 e são negativos para CD30. O número de linfócitos B é variável e pode atingir até 30% do infiltrado. As células T atípicas de tamanho médio a grande expressam PD-1, CXCL-13 e BCL-6 e são negativas para CD10 (Çetinözman et al., 2012).

A diferenciação de PLCT nodular da desordem linfoproliferativa de células T CD4⁺ pequenas/médias é um assunto controverso, pois apresentam sobreposição de inúmeras características histológicas e imunofenotípicas, inclusive expressão idêntica de PD-1, BCL-6 e CXCL-13 (Çetinözman et al., 2012). PLCT nodular e PLC misto nodular também devem ser diferenciados da MF estágio tumoral que se apresenta como infiltrados predominantemente dérmicos localizados com número variável de células T atípicas de tamanho médio ou grande.

A citomorfologia dos linfócitos é um critério importante para diferenciar essas entidades. O epidermotropismo no estágio MF tumoral é menos proeminente do que nos estágios iniciais da doença. No entanto, o critério mais importante para a discriminação é a apresentação clínica, especialmente a existência de patches e placas em MF. Outro diagnóstico diferencial abrange infiltração cutânea secundária como linfoma angioimunoblástico de células T que apresenta infiltrado de células T neoplásicas pequenas ou ligeiramente aumentadas com expressão de CD4 e PD-1 em associação com grande número de células B. O contexto clínico (principalmente sintomas B e envolvimento nodal), alto índice de proliferação e associação de EBV (Epstein-Barr vírus) em alguns casos, podem ser úteis para o diagnóstico (Mitteldorf e Kempf, 2020).

A foliculite pseudolinfomatosa compreende casos com infiltrados predominantemente perifoliculares. Foi relatado pela primeira vez em 1988 por Kibbi et al. e se manifesta principalmente como nódulo solitário com predileção pela face (Kibbi et al., 1988). Apresenta-se menos frequentemente através de várias lesões cupuliformes ou nodulares na face, couro cabeludo ou tronco (Romero-Pérez et al., 2016). Ocorre infiltrado linfocítico dérmico denso (células T e B) estendendo-se para o subcutâneo. Os folículos capilares são irregularmente aumentados e deformados com a permeação do epitélio por células linfoides (ativação dos folículos pilosos) (Hussein, 2013b). Uma característica importante é a exocitose proeminente de linfócitos nos folículos capilares. O infiltrado consiste predominantemente em linfócitos T CD3⁺ e CD4⁺, associação com número variável de linfócitos B é frequentemente encontrada. Numerosas células T também são positivas para PD-1 ou outros marcadores de células T foliculares auxiliares (Mitteldorf e Kempf, 2020). Agregados histiocíticos perifoliculares (S100⁺ e células CD1A⁺) são geralmente observados (Hussein, 2013b). Estudos de rearranjo mostram infiltrado policlonal (Bergman, 2010).

3.1.3.1.4 Pseudolinfoma de células T CD30⁺ nodular

Pseudolinfoma de células T CD30⁺ nodular representa um subtipo histológico de PLC de células T, que se caracteriza pela presença de células atípicas T CD30⁺ de tamanho médio a grande. Tem sido relatado no contexto de várias infecções e doenças (Kempf, 2006). Devido ao espectro clínico e histológico heterogêneo, é difícil atribuí-lo a apenas um grupo de PLC.

A literatura usa o termo pseudolinfoma T CD30⁺ se as células T CD30⁺ estiverem presentes no infiltrado, mesmo se o padrão for semelhante ao MF. A apresentação clínica inclui pápulas ou pequenos nódulos. Maioria destas lesões não sofre regressão espontânea durante semanas a meses, em contraste com a papulose linfomatoide que é clinicamente caracterizada por surtos alternados de surgimento e regressão de lesões. Pseudolinfoma de células T CD30⁺ nodular foi associado à reação de picada de artrópodes, escabiose (principalmente em nódulos escabióticos persistentes) e infecções por vírus (especialmente molusco contagioso, orf ou ectima contagioso, nódulo de ordenhador e infecção por herpes vírus) (Mitteldorf e Kempf, 2020).

Na histopatologia é caracterizado por um infiltrado linfocítico misto na derme, com células T CD30⁺ atípicas de tamanho médio a grande que coexpressam CD3 e CD4 ou, menos comumente CD8. As células T CD30⁺ não formam agrupamentos, mas são distribuídas pelo infiltrado. Podem ser encontradas numerosas células T pequenas, além disso, a presença de grande número de células B e plasmócitos podem ser indicativo para a existência de processo reativo. Em muitos casos, o diagnóstico correto pode ser feito apenas com a identificação da doença subjacente. A papulose linfomatoide (particularmente tipo A) é o diagnóstico diferencial mais importante. No PLCT nodular CD30⁺ ocorre menor número de células CD30⁺ com disposição mais dispersa e não organizado em feixes ou agrupamentos como na papulose linfomatoide (Mitteldorf e Kempf, 2020). Estudos de rearranjo mostram um padrão policlonal (Romero-Pérez et al., 2016).

3.1.3.2 Pseudolinfomas como simuladores de micose fungoide e outros LCCT

O termo “pseudo-MF” descreve um grupo de desordens de diferentes etiologias, que histologicamente simulam a MF. A correlação clínico-patológica é crucial para evitar interpretações errôneas. A “pseudo-MF” é caracterizada por infiltrado em faixa ou perivascular principalmente de pequenos linfócitos, que mostram exocitose na epiderme e podem exibir discreta atipia nuclear simulando assim o linfoma cutâneo epidermotrópico de células T. O predomínio de células CD4⁺ ou CD8⁺ pode ser encontrada, além de uma expressão variável de CD30⁺. Achados de atipia nuclear intensa, predominância de células médias a grandes, perda de marcadores de células pan-T e rearranjo monoclonal de genes de

TCR favorecem o diagnóstico de LCPCT. O diagnóstico diferencial de síndrome de Sézary (SS) pode ser excluído pelo exame de sangue periférico (Mitteldorf e Kempf, 2017).

3.1.3.2.1 Dermatite de contato linfomatoide

Trata-se de uma dermatite de contato alérgica crônica e persistente, histologicamente semelhante à MF. Foi descrita inicialmente em 1976 por Orbaneja et al. Apresenta-se clinicamente como pápulas e placas eritematosas pruriginosas generalizadas e descamativas (Romero-Pérez et al., 2016). Pode ocorrer eritrodermia esfoliativa (Ploysangam et al., 1998). Os principais agentes tópicos envolvidos são parafenilendiamina, ouro, níquel, zinco, formaldeído, etilenodiamina, cobalto (Magro et al., 2018), metilcloroisotiazolinona e metilisotiazolinona. Testes de contato evidenciam a sensibilização e ocorre resolução ao evitar a exposição aos alérgenos envolvidos (Romero-Pérez et al., 2016). Ocorre principalmente em adultos e afeta ambos os sexos (Mitteldorf e Kempf, 2020).

Na histopatologia ocorre infiltrado celular em faixa superficial com epidermotropismo de células T que se assemelha à MF. A espongirose epidérmica ou microvesiculação espongiótica podem estar presente, o que ajuda a diferenciá-la de MF que pode apresentar espongirose, mas não microvesiculação. Frequentemente, há edema na derme papilar, um achado que geralmente está ausente em MF (Engin et al., 2014). Falsas coleções de Pautrier (acúmulos intraepidérmicos de células de Langerhans) podem ser observadas e às vezes interpretadas erroneamente como verdadeiras coleções de Pautrier. Em contraste com MF, a proporção de linfócitos CD4⁺ a CD8⁺ é equilibrada. Linfócitos CD30⁺ podem estar presentes (Mitteldorf e Kempf, 2020).

3.1.3.2.2 Reação linfomatoide a drogas

Reação linfomatoide a drogas se apresenta comumente através de máculas ou pápulas (Mitteldorf e Kempf, 2020). Magro et al. mencionaram características clínicas que favorecem uma reação desencadeada por drogas: (a) um início abrupto com menos de 6 meses de duração, (b) simetria da erupção e (c) envolvimento de áreas fotoexpostas (Magro et al.,

2018). Na reação linfomatoide a drogas pode ocorrer predomínio de células T ou B. Curiosamente, diferenças individuais podem ser observadas: o mesmo fármaco pode ocasionar diferentes fenótipos a diferentes indivíduos (célula T ou célula B). A maioria dos casos de PLC desencadeados por medicamentos são PLCT, mas também foram relatados casos de PLCB. Geralmente máculas e/ou placas eritematosas infiltradas múltiplas e, ocasionalmente, eritrodermia são observados em PCLT induzidos por drogas. As principais drogas implicadas são a fenitoína e os inibidores da enzima conversora de angiotensina (Engin et al., 2014), outras drogas relacionadas aos PCL estão detalhadas em Tabela 1.

Muitos pacientes com erupções linfomatoides por drogas também são relatados sob o título PLC desencadeado por drogas ou síndrome de PLC desencadeado por drogas (Ploysangam et al., 1998). A síndrome de PLC desencadeada por drogas inclui duas reações adversas cutâneas a medicamentos: síndrome de hipersensibilidade (com sintomas constitucionais) e pseudolinfoma desencadeado por medicamento (sem sintomas constitucionais). A síndrome de hipersensibilidade tem início agudo e ocorre nos 2 primeiros meses após a ingestão da droga. No PLC desencadeado por medicamento os pacientes geralmente têm início insidioso de lesões assintomáticas únicas ou múltiplas (pápulas, nódulos ou placas). Ocorrem semanas a meses após a ingestão do medicamento. As lesões resolvem espontaneamente dentro de vários meses após a retirada da droga desencadeadora e pode reaparecer com a reintrodução da mesma droga (Hussein, 2013b).

Na reação linfomatoide a drogas observa-se infiltrado em faixa ou perivascular na derme superior com grau variável de exocitose de linfócitos. Alteração vacuolar na junção dermoepidérmica e queratinócitos apoptóticos podem estar presentes. Os eosinófilos são comumente encontrados, mas também podem estar ausentes. A imuno-histoquímica revela uma predominância de linfócitos CD4 ou CD8 e associação de um número variável de linfócitos CD30. Perda de marcadores de células pan-T não é observada (Mitteldorf e Kempf, 2017).

3.1.3.2.3 *Reticuloide actínico*

É uma dermatose fotossensitiva grave, crônica, persistente e pruriginosa que afeta quase exclusivamente homens mais velhos (Ploysangam et al., 1998). Acomete também

mulheres e apresenta aumento recente de frequência em homens e mulheres jovens com dermatite atópica. As causas exatas permanecem desconhecidas. Fotossensibilidade tanto para ultravioleta A (UVA) e B (UVB), bem como para luz visível além do comprimento de onda de 400 nm, são importantes na etiopatogenia (Engin et al., 2014). Manifestações clínicas ocorrem em áreas fotoexpostas (especialmente no rosto e pescoço) com pápulas e placas eritematoliquenoides. Alguns pacientes apresentam fácies leonina. É acompanhada por prurido intenso e sinais de irritação, como liquenificação e escoriação (Mitteldorf e Kempf, 2020). A linfadenopatia generalizada é comum. Em muitos pacientes, pode ocorrer eritrodermia. O quadro eritrodérmico pode simular a SS ou MF eritrodérmica (Engin et al., 2014).

Os achados histopatológicos do reticuloide actínico mostram acantose epidérmica com espongiose discreta. O infiltrado é predominantemente localizado na derme superficial e composto por pequenos linfócitos T (alguns com atipia discreta) eosinófilos e plasmócitos. As células T são predominantemente positivas para CD8. Especialmente em pacientes eritrodérmicos, um aumento do número de células T CD8⁺ circulantes (relação CD4:CD8 invertida) é característico (Mitteldorf e Kempf, 2020). Análise do gene do TCR não mostra proliferação clonal de células T (Engin et al., 2014).

3.1.3.2.4 Pseudolinfoma de células T CD8⁺ na imunodeficiência

O Pseudolinfoma de células T CD8⁺ ocorre em quadros de imunodeficiência. Particularmente em pacientes com infecção por HIV e especialmente naqueles com imunossupressão comprovada e carga viral elevada. Características semelhantes foram descritas recentemente em transplantados renais. Um amplo espectro clínico é relatado, com ocorrência de placas eritematoinfiltradas, eritrodermia, hiperqueratose palmoplantar e linfadenopatia generalizada. Portanto, o quadro pode clinicamente simular SS. Alguns investigadores relataram piora do quadro cutâneo após exposição à luz ultravioleta. Na histopatologia do PLC de células T CD8⁺ em quadros de imunodeficiência, encontra-se um infiltrado dérmico superficial com epidermotropismo. Os linfócitos são predominantemente pequenos sem atipia nuclear. Os linfócitos são CD3⁺ e mostram domínio de CD8⁺, com expressão de marcadores citotóxicos (granzima B, TIA-1). Os eosinófilos estão

frequentemente associados. Estudos moleculares evidenciam a natureza policlonal do infiltrado cutâneo, mas linfócitos clonais podem ser encontrados no sangue periférico (Mitteldorf e Kempf, 2020).

3.1.3.2.5 Infecções simuladoras de linfomas de células T

Várias infecções, em particular aquelas causadas por vírus e parasitas, podem mostrar densos infiltrados ricos em linfócitos, simulando assim um linfoma (Mitteldorf e Kempf, 2017). A *Borrelia* além do conhecido LC também pode induzir infiltrados pseudolinfomatosos ricos em células T (Mitteldorf e Kempf, 2020).

A leishmaniose cutânea pode simular histologicamente o linfoma e pode ocorrer dificuldade diagnóstica especialmente em casos com baixo número de parasitas. O infiltrado é composto por numerosos linfócitos, histiócitos e plasmócitos. A detecção do agente é essencial para fazer um diagnóstico correto. Estudos moleculares demonstram que o exame de PCR é útil para identificar o agente se o mesmo não puder ser identificado pela histologia convencional ou colorações especiais (por exemplo, coloração Giemsa) (Mitteldorf e Kempf, 2017).

Em infecções por vírus varicela zoster (VZV) e herpes simplex vírus (HSV), podem ocorrer infiltrados ricos em linfócitos sem alterações epiteliais patognomônicas típicas do HSV. Detecção de antígenos virais por imuno-histoquímica e / ou detecção de DNA viral por PCR permite identificar esses infiltrados de células T como reações relacionadas ao HSV (Mitteldorf e Kempf, 2017).

A sífilis secundária e terciária tem sido descrita como simuladoras de linfoma de células B e T. O espectro histopatológico da sífilis é amplo (Mitteldorf e Kempf, 2020). Histologia das lesões de sífilis secundária e menos frequentemente sífilis primária ou terciária podem ocasionalmente revelar um infiltrado linfoplasmocitário que simula linfoma cutâneo de células B da zona marginal. A coexistência de dermatite liquenoide/interface ou inflamação granulomatosa são pistas diagnósticas importantes. Estudos de rearranjo mostram padrão policlonal e coloração imuno-histoquímica específica para *Treponema pallidum*

confirmam a presença destes organismos. As lesões têm rápida resolução após tratamento com antibióticos (Romero-Pérez et al., 2016).

Infecções por poxvírus (parapoxvírus do nódulo de ordenhador, orf e molusco contagioso) podem induzir atipia de linfócitos T e expressão de células T CD30⁺, que pode ser desafiador na diferenciação de desordens linfoproliferativas CD30⁺ (Mitteldorf e Kempf, 2020).

3.1.3.2.6 Dermatoses inflamatórias simuladoras de linfomas cutâneos de células T

Várias doenças inflamatórias, especialmente quadros com epidermotropismo proeminente ou alteração da zona de interface, podem ser interpretadas erroneamente como MF ou outros linfomas de células T epidermotrópico. Esses distúrbios incluem líquen plano, líquen escleroso e atrófico, dermatite purpúrica pigmentada e pitíriase liquenoide (Mitteldorf e Kempf, 2020). Por outro lado, MF pode às vezes apresentar uma dermatite de interface. Além disso, doenças inflamatórias com infiltrados dérmicos e / ou subcutâneos rico em linfócitos, como lúpus eritematoso, em particular o tipo tímido e paniculite lúpica, precisam ser diferenciados de LCPCT, particularmente o linfoma subcutâneo de células T paniculite-símile (Mitteldorf e Kempf, 2017).

3.1.3.3 Outros Pseudolinfomas

3.1.3.3.1 Pseudolinfoma angiomatoide rico em células T

Nos últimos anos, tem sido sugerido que angioqueratoma pseudolinfomatoso acral, pseudolinfoma polipoide angiomatoide rico em células T, hiperplasia angioplasmocelular cutânea primária e a placa linfoplasmocitoide pertencem ao espectro de doenças relacionadas ao subgrupo do pseudolinfoma angiomatoide rico em células T (Mitteldorf e Kempf, 2020), conforme detalhados a seguir:

- a) angioqueratoma pseudolinfomatoso acral: originalmente descrito pelo acrônimo APACHE (Acral Pseudolymphomatous Angiokeratoma of Children), é uma condição rara benigna de etiologia e patogênese desconhecidas (Romero-Pérez et al., 2016). Foi associado inicialmente pela ocorrência em crianças (Kaddu et al., 1994), mas foi demonstrado que também pode afetar adultos e sua localização não é exclusivamente acral (Wagner et al., 2014). Alguns investigadores consideram que as lesões representem reações persistentes à picada de artrópodes, enquanto outros consideram como um processo vascular benigno com infiltrado linfocítico proeminente, ou seja, uma forma de PLC. Clinicamente, manifesta-se como uma erupção unilateral de pápulas angiomasas agrupadas eritematovioláceas (diâmetro de 1-5 mm). Ocorre infiltrado de pequenas células policlonais T e B, eosinófilos, plasmócitos e histiócitos. Em alguns casos, células gigantes histiocíticas estão presentes. Vasos de paredes espessas revestidos por endotélio edemaciado são tipicamente encontrados no infiltrado (Mitteldorf e Kempf, 2017);
- b) pseudolinfoma polipoide angiomatoide rico em células T: é uma variante polipoide, mais comum em mulheres do que em homens (mulheres: masculino = 16: 3). A idade média de manifestação é de 39 anos (variação, 16-71 anos) (Dayrit et al., 2011). Apresenta-se como pequenas pápulas angiomasas polipoides (<1,0 cm), com predileção pela cabeça e tronco (Hussein, 2013b), mas também é relatado em outras localizações (Dayrit et al., 2011). Na histopatologia apresenta numerosos vasos com endotélio edemaciado acompanhado de denso infiltrado dérmico de células T, histiócitos e plasmócitos. Em metade dos casos também foram encontrados eosinófilos (Mitteldorf e Kempf, 2020);
- c) hiperplasia cutânea primária angioplasmocelular: apresenta-se com um nódulo solitário (ou alguns nódulos agrupados), geralmente localizado na área da cabeça e pescoço. A idade média é de 45 anos e a distribuição por gênero é igual. Caracterizada por capilares dilatados circundados por um infiltrado politípico rico em plasmócitos. A proporção de plasmócitos variam de 70% a 90%, associadas com linfócitos e ocasionalmente neutrófilos (Hsiao e Wu, 2011);
- d) placa linfoplasmocítica: foi originalmente relatada em crianças na região pré-tibial (Fried et al., 2010), mas também pode afetar adultos e acometer tronco e braços. As mulheres são mais comumente afetadas. Apresentação clínica é distinta, como uma

placa circunscrita de longa data acompanhada por pápulas avermelhadas e acastanhadas dispostas linearmente. O diagnóstico é baseado na correlação clínico-patológica. A histopatologia revela um infiltrado superficial, tipo em faixa, nodular profundo ou intersticial; frequentemente acentuado em torno de vasos ou estruturas anexiais. A epiderme é geralmente hiperplásica. O infiltrado consiste em linfócitos e histiócitos com numerosos plasmócitos policlonais responsáveis por até 25% de todo o infiltrado. Células gigantes histiocíticas e aumento do número de vasos são encontrados. Os histiócitos podem formar granulomas em torno dos feixes de colágeno esclerótico, chamados de "pseudorosetas" (Mitteldorf et al., 2015).

3.1.3.3.2 Plasmocitose cutânea

É uma doença rara que normalmente afeta adultos (Uhara et al., 1994) entre terceira e quinta décadas, especialmente no Japão e outros países asiáticos. Apresenta-se clinicamente com pequenas placas e múltiplos nódulos acastanhados, ocorrendo na face, pescoço e tronco. Hipergamaglobulinemia policlonal é a associação mais comumente relatada (Watanabe, 1986). Em alguns pacientes estão presentes outros sinais de envolvimento sistêmico (por exemplo, hepatoesplenomegalia e linfadenopatia). Os achados histopatológicos mostram um infiltrado dérmico superficial e profundo composto predominantemente de plasmócitos policlonais maduros sem atipia (Wagner et al., 2013).

3.1.3.4 Pseudolinfoma intravascular

3.1.3.4.1 Linfoproliferação intravascular atípica benigna de células T CD30⁺

Recentemente, um acúmulo de blastos linfoides intravasculares CD30⁺ ou CD30⁻ foi relatado e denominado proliferação intravascular atípica benigna de células T CD30⁺ ou proliferação intralinfática de blastos linfoides de células T (Riveiro-Falkenbach et al., 2013). Este achado está associado com doenças inflamatórias da pele, tumores ou traumas (Kempf et al., 2014). Ocorre acúmulo de grandes linfócitos ativados com morfologia semelhante a

blastos dentro dos vasos linfáticos e o infiltrado inflamatório circundante é característico. As células expressam marcadores de células T (CD3, CD4) e na maioria dos casos CD30. Os estudos de clonalidade demonstram policlonalidade. O diagnóstico diferencial mais importante é a manifestação intravascular das desordens linfoproliferativas CD30⁺ (Mitteldorf e Kempf, 2020).

3.1.4 Métodos diagnósticos dos PLC

No diagnóstico de PLC, é importante compreender que nem as características clínicas nem histológicas permitem classificação correta como linfoma ou pseudolinfoma. Apenas uma combinação de achados clínicos, características histológicas e o curso da doença podem resultar no correto diagnóstico (Miguel et al., 2018).

A investigação diagnóstica inclui histórico médico (em particular, exposição a artrópodes, alérgenos, material exógeno e drogas) e exame físico (com a palpação de linfonodos). Além disso, o exame de sangue periférico (hemograma e sorologia para agentes de doenças infecciosas, especialmente *B. burgdorferi*, sífilis, e HIV - dependendo do tipo de infiltrado) é recomendado. PLC representam proliferações linfocíticas benignas sem potencial para disseminação extracutânea, assim investigação com estadiamento geralmente não é indicado. Exames de estadiamento (TC ou PET-TC) devem ser considerados, especialmente em casos de manifestação incomum (por exemplo, lesões nodulares múltiplas, expressão monotípica de cadeias leves de imunoglobulina (Ig), detecção de clonalidade de células T ou B, ou outro achado histológico, fenotípico ou genotípico inconsistente ou inesperado) (Mitteldorf e Kempf, 2017).

Por quase 100 anos, a classificação dos distúrbios linfoproliferativos cutâneos baseava-se apenas em critérios histológicos e clínicos. Novas técnicas, como IHQ, análise citogenética e análise do rearranjo gênico; têm proporcionado significativa melhoria na determinação da linhagem linfoide e diferenciação entre infiltrados linfoproliferativos malignos e reativos na pele. O uso de técnicas IHQ e estudos de rearranjo gênico devem ser considerados nos casos em que a natureza benigna versus maligna de uma lesão não é clara (Ploysangam et al., 1998).

As características imunofenotípicas e a análise molecular (clonalidade) podem auxiliar na diferenciação de PLC dos LCPCB. A ausência de alterações reativas (alterações epidérmicas e dérmicas), associada com a expressão de cadeias leves monotípicas e rearranjos gênicos clonais de imunoglobulina favorecem o diagnóstico de linfomas de células B sobre PLCB. A presença de epidermotropismo proeminente, linfócitos grandes atípicos e rearranjos gênicos clonais de receptores de células T favorecem o diagnóstico de linfomas de células T sobre PLCT (Hussein, 2013b).

A pesquisa das cadeias leves K e L de Ig, é utilizada para o estudo da clonalidade nas populações linfocitárias, através do estudo IHQ. Entretanto, verifica-se dificuldade técnica, durante o processamento histológico, na realização do exame IHQ para a pesquisa dessas cadeias. Frequentemente há o comprometimento de integridade das Ig da superfície celular, podendo, assim, ocorrer sua liberação no interstício, levando a um alto *background* (reação inespecífica de fundo), dificultando a interpretação da reatividade para as cadeias leves K e L (Alves et al., 1999). Além da imuno-histoquímica para cadeias leves de K e L, estudos moleculares podem ser usados para detectar clonalidade, através dos estudos de rearranjos gênicos de TCR e Ig. Ausência de clonalidade de células plasmocíticas, como demonstrado por reações imuno-histoquímicas para as cadeias leves policlonais K e L, e por estudos de rearranjos gênicos TCR e Ig, também favorece o PLC (Bergman, 2010).

PLC devem ser separados dos linfomas cutâneos, a diferenciação deve ser baseada na correlação de características clínicas, imunomorfológicas e moleculares, bem como dados de acompanhamento (Hussein, 2013b).

3.1.5 Tratamento dos PLC

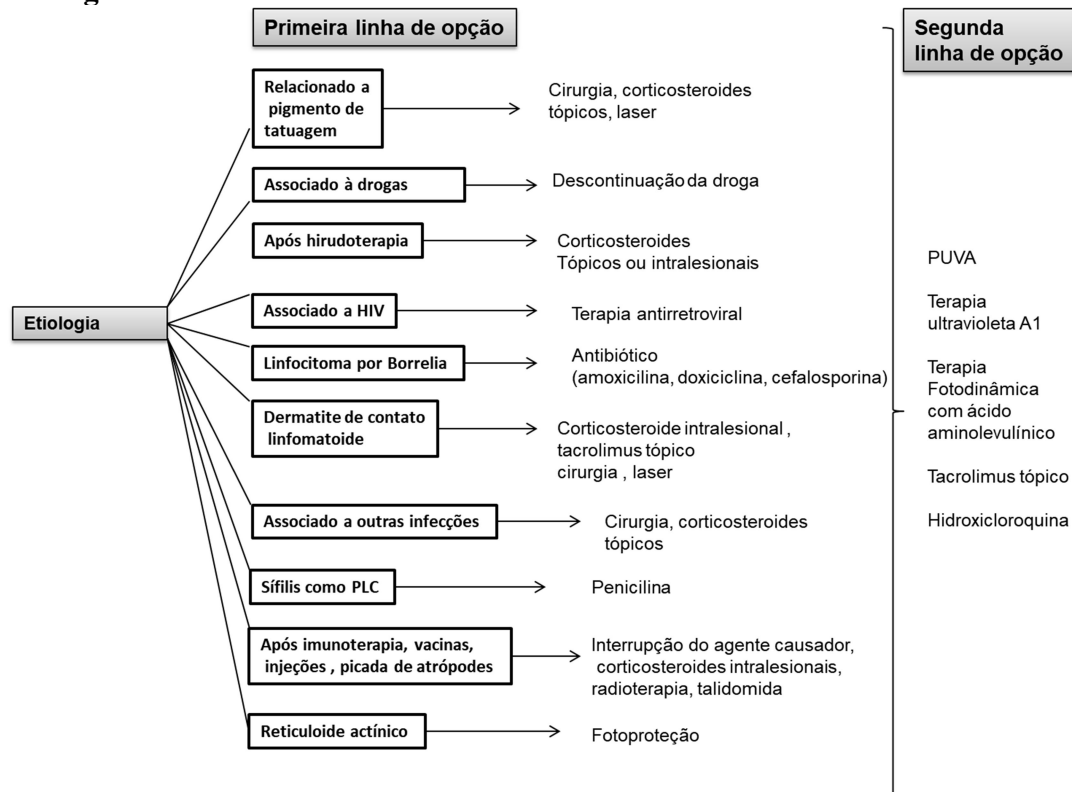
O manejo do PLC pode ser difícil, com várias opções terapêuticas, incluindo agentes tópicos e intralesionais, agentes sistêmicos e modalidades físicas, mostrando respostas dermatológicas variáveis (Miguel et al., 2018). Em geral, lesões solitárias podem ser tratadas por excisão cirúrgica. As opções alternativas de tratamento são corticosteroides tópicos ou intralesionais e crioterapia. Especialmente em PLC induzido por tatuagem, a terapia com laser é relatada como efetiva. Se essas abordagens terapêuticas não tiverem sucesso, a radioterapia pode ser considerada. Em pacientes com múltiplas lesões de PLC, em particular quadros com

lesões multifocais e idiopáticas, corticosteroides sistêmicos, interferon alfa intralesional ou sistêmico ou hidroxicloroquina oral podem ser usados (Mitteldorf e Kempf, 2017). Em PLC disseminado, antimaláricos, fotoquimioterapia ou agentes citotóxicos têm sido ocasionalmente usados (Ploysangam et al., 1998). Evitar a reexposição ao agente indutor (por exemplo drogas, vacinas, injeção de alérgeno, terapia com *Hirudo medicinalis*, acupuntura e tatuagem) é um passo importante para prevenir a persistência e recorrência do PLC (Mitteldorf e Kempf, 2017).

Na reação linfomatoide a drogas, o curso é geralmente benigno, com resolução completa em 1 a 8 semanas após suspensão da droga desencadeadora. Na dermatite de contato linfomatoide, evitar os alérgenos responsáveis e o tratamento com corticosteroides tópicos são importantes para resolução do quadro. Terapia escabicida geralmente é ineficaz na sarna nodular. A resolução espontânea ocorre com frequência e os corticosteroides intralesionais são benéficos. Reticuloide actínico apresenta um curso crônico. Geralmente são irresponsivos à terapia convencional de distúrbios fotossensíveis, como antimaláricos ou betacaroteno. Fotoproteção rigorosa é crucial (Ploysangam et al., 1998).

Miguel et al. publicaram uma revisão sistemática da literatura dos últimos 25 anos que sugere opções de tratamento (primeira e segunda linhas de opção terapêutica) dos PLC baseadas em etiologias específicas (Figura 2). Porém uma grande proporção de casos de PLC são idiopáticos e, se nenhum tratamento for realizado, um acompanhamento vigilante é recomendado devido à possível evolução do PLC para linfoma (Miguel et al., 2018).

Figura 2 - Classificação dos tratamentos dos pseudolinfomas cutâneos conforme etiologia



FONTE: Miguel et al., 2018.

PLC: pseudolinfoma cutâneo, PUVA: terapia com associação de psoraleno e ultravioleta A.

3.2 Linfomas cutâneos primários de células B

3.2.1 Histórico e conceito

Os linfomas cutâneos primários (LCP) são definidos como linfomas não Hodgkin (LNH) que se apresentam na pele sem evidência de doença extracutânea ao diagnóstico (Willemze et al., 2019). Por definição, os LCP manifestam-se primeiramente na pele. No momento do diagnóstico, não exibem envolvimento de outros órgãos, conforme determinado por estudos de estadiamento, enquanto linfomas cutâneos secundários constituem manifestações cutâneas de linfomas nodais. Apesar de designações semelhantes em alguns casos (como linfoma de zona marginal e linfoma difuso de células grandes de células B), não apenas as características clínicas, mas também histopatológicas e moleculares dos linfomas cutâneos diferem dos linfomas sistêmicos /disseminados (Dippel et al., 2017).

É fundamental distinguir LCPCB de linfomas B sistêmicos com acometimento secundário da pele, pois o comportamento clínico, prognóstico e manejo diferem consideravelmente. Historicamente, essas diferenças no comportamento clínico não eram bem reconhecidas, e sistemas de classificação anteriores agruparam o LCPCB com linfomas sistêmicos de células B de histologia semelhante (Suárez et al., 2013). O reconhecimento de linfomas com origem em órgãos extranodais, incluindo linfomas cutâneos, refletiu uma mudança na abordagem de distúrbios linfoproliferativos, e representou um dos maiores avanços na classificação de tumores hematológicos da Organização Mundial de Saúde (OMS) (Cerroni, 2017).

Na última década, o consenso de classificação da força-tarefa da OMS com a EORTC serviu como um padrão ouro para o diagnóstico e classificação dos LCP. Esta classificação foi publicada em 2005 e incluída na classificação da OMS de 2006 (*Skin Tumors Blue Book*). A maior parte dessa classificação foi subsequentemente incorporada na classificação da OMS de 2008 e na revisão de 2016. Em 2018, houve uma versão atualizada da classificação OMS-EORTC (Tabela 5) e a mesma foi publicada na quarta edição do livro de classificação de tumores de pele da OMS. Em comparação com a classificação OMS-EORTC de 2005, algumas novas entidades provisórias foram adicionadas e algumas terminologias de outras condições foram modificadas (Willemze et al., 2019).

3.2.2 Aspectos epidemiológicos e etiologia

Após os linfomas gastrointestinais, os LCP são o segundo grupo mais comum de LNH extranodais (Willemze et al., 2018). LCP incluem um grupo heterogêneo de LCPCT e LCPCB. No mundo ocidental, LCPCT constituem de 75% a 80% de todos os LCP e LCPCB de 20% a 25% dos casos (Willemze et al., 2019). A incidência dos LCPCB tem aumentado ao longo de décadas, com uma taxa de incidência global anual ajustada por idade de 3,1 casos por milhão de pessoas. Nos Estados Unidos, os LCPCB afetam mais comumente homens do que mulheres, e a incidência aumenta exponencialmente com a idade. Em contraste com a MF, que apresenta uma taxa de incidência estatisticamente maior em negros, LCPCB é quase exclusivamente uma doença de brancos não hispânicos (Bradford et al., 2009).

A fisiopatologia da LCPCB é apenas parcialmente compreendida. Acredita-se que iniciem como processos linfoproliferativos inflamatórios reativos e que a linfomagenese ocorra em etapas sucessivas. Portanto, há “casos limítrofes” nos quais é difícil distinguir entre pseudolinfomas (hiperplasias linfoides reativas) e linfomas reais. A transição de uma condição pré-neoplásica para uma condição neoplásica parece ser determinada pelo desequilíbrio entre proliferação celular e apoptose, desregulação das principais vias bioquímicas para transmissão do sinal intracelular, adesão e migração celular, bem como expressão de oncogenes e/ou inibição de genes supressores de tumor. A estimulação antigênica crônica e as infecções virais e bacterianas parecem ser fatores predisponentes, mas estudos para apoiar essas suposições são escassos e, na maioria dos casos, o agente etiológico não é conhecido. Em relação às infecções virais, um papel importante do EBV e o herpes vírus humano tipo 8, foi observado na gênese de alguns linfomas, particularmente naqueles que ocorrem em indivíduos imunocomprometidos, como em pacientes infectados pelo HIV e em transplantados. Destaca-se também a possível associação entre a infecção pelo vírus da hepatite C e o LCPCB. Em relação às bactérias, o LCPZM tem sido associado à infecção por *B. burgdorferi*, embora o tema ainda seja controverso (Lima, 2015).

3.2.3 Aspectos classificatórios, manifestações clínicas e histopatologia

Na classificação OMS-EORTC de 2005, três importantes entidades patológicas da LCPCB foram reconhecidas: linfoma B cutâneo primário da zona marginal (LCPZM), linfoma B cutâneo primário centrofolicular (LCPCF) e linfoma cutâneo primário difuso de grande célula B, tipo perna (LCPDGCB-TP). O LCPCF e LCPDGCB-TP, foram mantidos como entidades separadas na classificação da OMS de 2008 para tumores hematopoiéticos e tecidos linfoides e em sua revisão de 2016. Em contraste, LCPZM não foi mais categorizado separadamente, mas foi incluído no amplo grupo de linfomas extranodais da zona marginal de tecido linfoide associado à mucosa (linfoma MALT), não obstante diferenças na histologia, perfil genético e comportamento clínico. Úlcera mucocutânea EBV⁺ foi incluída como uma nova entidade provisória na revisão de 2016 da classificação da OMS e na classificação do OMS-EORTC atualizada em 2018 (Tabela 5) (Willemze et al., 2019).

O LCPZM e LCPCF são tipos indolentes de LCPCB com sobrevida relacionada à doença em 5 anos superior a 90%, enquanto o LCPDGCB-TP tem um prognóstico mais desfavorável (sobrevida relacionada à doença em 5 anos, aproximadamente 50%) (Willemze et al., 2018).

Tabela 5 - Classificação dos linfomas cutâneos da OMS - EORTC revisada em 2018

Classificação dos linfomas cutâneos primários

Linfomas cutâneos de células T

Micose fungoide

Micose fungoide – variantes

- MF foliculotrópica
- Reticulose pagetoide
- Cútis laxa granulomatosa

Síndrome de Sézary

Linfoma/leucemia de célula T do adulto

Desordens linfoproliferativas CD30⁺ cutâneas primárias

- Linfoma anaplásico de grande célula T CD30⁺ cutâneo primário
- Papulose linfomatoide

Linfoma subcutâneo de célula T paniculite-símile

Linfoma de célula T/NK extranodal, tipo nasal

Infecção crônica ativa por EBV

Linfoma cutâneo primário periférico de célula T, subtipos raros

- Linfoma cutâneo primário de célula T γ/δ

(continua)

Classificação dos linfomas cutâneos primários

(continuação)

- Linfoma cutâneo primário de célula T CD8⁺ citotóxica epidermotrópico agressivo^a
- Desordem linfoproliferativa de célula T CD4⁺ pequena/média^a
- Linfoma cutâneo primário de célula T CD8⁺ acral^a

Linfoma cutâneo primário de célula T periférico, sem outra especificação

Linfomas cutâneos de células B

Linfoma B cutâneo primário da zona marginal

Linfoma B cutâneo primário centrofolicular

Linfoma cutâneo primário difuso de grande célula B, tipo perna

Úlcera mucocutânea EBV⁺^a

Linfoma intravascular de grande célula B

^a Entidades provisórias

FONTE: Willemze et al., 2019.

3.2.3.1 Linfoma B cutâneo primário centrofolicular

LCPCF é o subtipo mais comum de linfoma cutâneo de células B e compreende cerca de 12% de todos os LCP (Willemze et al., 2019). Mais comumente afeta pacientes de meia-idade (Elder et al., 2018), com predomínio em homens (1,5 vezes mais comum em homens do que mulheres). Representa cerca de 60% de todos os LCPCB (Goyal et al., 2019).

É um linfoma indolente que se apresenta como nódulos, placas ou pápulas solitárias ou agrupadas, com distribuição predominantemente loco-regional, e mostra uma preferência pela região de tronco, cabeça e pescoço (Willemze et al., 2005; Vitiello et al., 2020). Lesões multifocais também são observadas em minoria dos pacientes (Willemze et al., 2005). Ulcerações raramente são observadas. Sem tratamento, as lesões podem ficar estáveis ou aumentar lentamente, muitas vezes após alguns anos (Vitiello et al., 2020). Ocorrem raras apresentações na perna, associadas a um pior prognóstico. A regressão espontânea é rara. Alguns casos apresentam áreas alopecicas do couro cabeludo (Dumont et al., 2020).

A disseminação para sítios extracutâneos ocorre em aproximadamente 10% dos casos. Embora geralmente indolente, a recorrência após o tratamento é comum, ocorrendo em 30 % dos casos (Elder et al., 2018). É importante ressaltar que a recorrência não afeta o prognóstico e geralmente está confinada à pele. O diagnóstico diferencial inclui acne, cistos de inclusão epidérmica, picadas de artrópodes, HLC e outras neoplasias cutâneas (Suárez et al., 2013).

Caracterizado por nódulos irregulares justapostos que assemelham a folículos ou agregados difusos de células B de tamanho médio com fenótipo de centro germinativo (Goyal et al., 2019). É composto de células neoplásicas foliculares, especificamente centrócitos associado a número variável de centroblastos (Swerdlow et al., 2013). Os tumores envolvem a derme e tecido subcutâneo. Classicamente, os folículos apresentam perda de polarização com zona de manto pouco desenvolvida ou ausente, ausência de macrófagos com corpos tingíveis, extensão de células neoplásicas além das tramas de CDF e baixo índice de proliferação (Goyal et al., 2019). Podem ter padrão de crescimento folicular, folicular e difuso, ou difuso (Senff et al., 2007). Esses padrões de crescimento não alteram o comportamento ou prognóstico (Suárez et al., 2013). Em contraste com os linfomas foliculares nodais, nos LCPCF não é atribuído um grau histológico com base na arquitetura e citomorfologia (Goyal et al., 2019). As células T reativas podem ser numerosas e um componente estromal proeminente geralmente está presente (Elder et al., 2018).

Os achados imuno-histoquímicos são variáveis: todos os casos expressam marcadores de centros germinativos, na maioria das vezes BCL-6 com coexpressão variada e heterogênea de CD10, STMN1, LMO2, HGAL e AID (Goyal et al., 2019). O CD10 é geralmente positivo em lesões com padrão de crescimento folicular, mas negativo em lesões com padrão de crescimento difuso (Elder et al., 2018). BCL-2 pode ser negativo ou positivo em LCPCF e não pode distinguir com segurança LCPCF de linfomas foliculares nodais. É relevante salientar que BCL-2⁺ pode ocorrer em ambos linfomas, embora a ocorrência seja menor no LCPCF (Goyal et al., 2019). Além disso, a maioria dos pacientes não apresentam translocação t(14; 18) que envolve o locus BCL-2, em contraste com o linfoma folicular nodal (Vitiello et al., 2020). A expressão de MUM-1 / IRF4 e *Forkhead box P1* (FOX-P1) é negativa na maioria dos casos. Raros casos de LCPCF que expressam FOX-P1 têm um prognóstico menos favorável (Suárez et al., 2013). CD43 e CD5 são negativos (Elder et al., 2018).

LCPCF é composto por células B monoclonais, mas pode não expressar imunoglobulina de superfície (Swerdlow et al., 2013). A imuno-histoquímica de cadeia K e L geralmente não é útil no LCPCF, mas estudos de rearranjo do gene IgH podem confirmar a clonalidade quando necessário (Goyal et al., 2019). *Primers* de BIOMED-2 são relatados por demonstrar clonalidade de células B em 91% a 100% dos casos, com ocorrência de 4% a 22% em proliferações “clonais” reativas. Lesões diferentes no mesmo paciente podem, no entanto, apresentar clonalidades diferentes. Alguns linfomas de células B podem demonstrar

rearranjos do gene TCR. Também se deve atentar para possibilidade de “pseudoclonalidade” de células T quando apenas algumas células T estão presentes na amostra (Swerdlow et al., 2013).

3.2.3.2 Linfoma B cutâneo primário da zona marginal

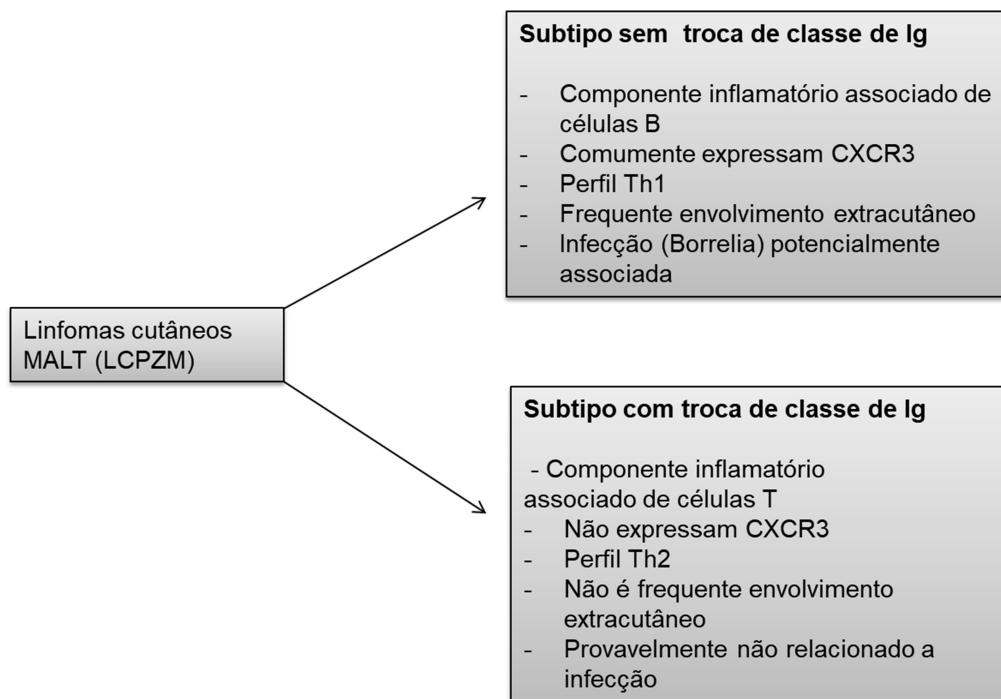
LCPZM é responsável por cerca de 20-40% de todos os LCPCB nos países ocidentais, com uma incidência estimada de 0,4 por 1.000.000 por ano nos Estados Unidos (Bradford et al., 2009). Representam aproximadamente 9% de todos os LCP. Particularmente adultos jovens são afetados (Willemze et al., 2019). A mediana de idade dos pacientes acometidos é de 50 a 53 anos, com variação de 6 anos até 93 anos (Goyal et al., 2019). Ocorre duas vezes mais frequente em homens do que em mulheres (Senff et al., 2007).

Apresentam-se como placas ou nódulos localizados solitários ou, mais comumente, multifocais preferencialmente no tronco e nos braços. As recidivas cutâneas são comuns, em particular em pacientes que apresentam lesões cutâneas multifocais, mas a disseminação para locais extracutâneos raramente é observada. Ocorre curso clínico indolente com excelente prognóstico (Willemze et al., 2019).

Estudos recentes sugerem a existência de 2 subtipos de LCPZM (Van Maldegem et al., 2008), como detalhado em Figura 3 (Fernandez-Flores, 2013). A maioria dos LCPZM expressam troca de classe de Ig (IgG, mais raramente IgA ou IgE) e não expressam o receptor de quimiocina CXCR3, que foi sugerido desempenhar um papel no direcionamento das células B malignas para o tecido maligno associado à mucosa. Estes casos mostram domínio de células T e uma pequena proporção de células B neoplásicas (Willemze et al., 2019). Desenvolvem em um ambiente com resposta imunológica com perfil Th-2 e não evidenciam associação com a infecção causada por *B. burgdorferi* (Fernandez-Flores, 2013). Ao contrário de linfoma de zona marginal ocorrendo em outros locais, esses casos que expressam troca de classe de Ig não mostram colonização de centros germinativos reativos por células B neoplásicas, lesões linfoepiteliais ou transformação em linfoma difuso de grandes células B, e são considerados por alguns autores como uma desordem linfoproliferativa cutânea crônica clonal em vez de um linfoma (Willemze et al., 2019).

O outro subgrupo de LCPZM (não associado à troca de classe de Ig) mostra uma proliferação difusa ou nodular de células B neoplásicas que expressam IgM e frequentemente CXCR3 (Willemze et al., 2019). Comumente se desenvolvem em um ambiente com predomínio de células B reativas e resposta imunológica com perfil Th-1 (Fernandez-Flores, 2013). Tem associação com a infecção por *B. burgdorferi* (Van Maldegem et al., 2008). Estes casos compartilham muitas características com os linfomas MALT extranodais de outros locais e são mais propensos ao desenvolvimento de doença extracutânea (Willemze et al., 2019).

Figura 3 - Representação esquemática dos subtipos principais de linfomas MALT cutâneos



FONTE: modificado de Fernandez-Flores, 2013.

Os dois subtipos principais de linfomas MALT cutâneos (linfoma cutâneo primário da zona marginal) e as principais características

Os 2 subgrupos distintos de LCPZM são caracterizados por infiltrados linfoides dérmicos nodulares e difusos (*bottom-heavy*) que se estendem até o tecido subcutâneo e geralmente poupam a epiderme. O subgrupo com troca de classe de Ig exibe um infiltrado polimorfo semelhante a hiperplasia linfoide reativa. Ambos subtipos podem ser

acompanhados por folículos com centro germinativo maduros ou residuais colonizados por células neoplásicas. As células B neoplásicas são pequenas e podem ter aparência monocitoide, clivadas ou arredondadas. Os dois subtipos podem mostrar diferenciação plasmocítica variável, que varia de plasmócitos esparsos a diferenciação plasmocitoide exclusiva (anteriormente denominado imunocitoma). Plasmócitos atípicos, incluindo formas binucleadas e corpos de Dutcher, são comuns na maioria dos casos LCPZM com diferenciação plasmocítica (Goyal et al., 2019).

As células neoplásicas de LCPZM apresentam imunofenótipo CD20⁺, CD79a⁺, BCL2⁺, CD5⁻, CD10⁻ e BCL6⁻. Diagnóstico diferencial com PLCB é difícil, e os testes moleculares são frequentemente necessários para demonstrar o rearranjo clonal do gene da cadeia pesada de Ig (IgH) (Vitiello et al., 2020). O rearranjo da cadeia pesada é detectado em cerca de 60% a 70% dos casos (Kempf e Mitteldorf, 2015). Através dos protocolos de PCR BIOMED-2 pode ser detectado população clonal de células B em 80% dos LCPZM e 4% dos infiltrados benignos, em outro estudo os resultados foram 83% dos LCPZM e 22% dos infiltrados benignos. Rearranjo clonal de TCR ocorreu em 35% dos linfomas MALT, (incluindo linfomas MALT cutâneos) através de *primers* do protocolo BIOMED-2 (Swerdlow et al., 2013). Plasmócitos monotípicos podem ser encontrados em 85% dos casos, com predomínio de K em dois terços dos pacientes. (Kempf e Mitteldorf, 2015). Populações de células B com expressão biclonal de restrição de cadeia K e L tem sido demonstrada em alguns casos de LCPZM (Suárez et al., 2013).

3.2.3.3 Linfoma cutâneo primário difuso de grande célula B, tipo perna

LCPDGCB-TP é um tipo raro e agressivo de LCPCB que afeta particularmente mulheres idosas (Willemze et al., 2019). A idade média de início é cerca de 70 anos, as mulheres são de 2 a 4 vezes mais acometidas do que os homens (Goyal et al., 2019). Representam 4% de todos os linfomas cutâneos (Willemze et al., 2019) e aproximadamente 10% a 20% dos LCPCB (Dumont et al., 2020).

Geralmente se apresentam como tumores com crescimento rápido em uma ou ambas as pernas, ou em outros locais além das pernas em 15% a 20% dos casos (Willemze et al., 2019). São caracterizados como tumores ou nódulos eritematovioláceos na perna de 2 cm a 5

cm. Os pacientes geralmente apresentam uma única lesão ou grupo de lesões no momento do diagnóstico (Goyal et al., 2019). Pacientes com envolvimento da perna tem maiores taxas de disseminação extracutânea do que aqueles com lesões em outros sítios (respectivamente 33% e 18%) (Grange et al., 2007). Apresentam pior prognóstico, morte não é incomum e os pacientes podem apresentar sintomas B (Vitiello et al., 2020).

O quadro histológico é caracterizado por um infiltrado dérmico difuso composto em grande parte por uma população monótona de centroblastos e imunoblastos (Willemze et al., 2019), com alta atividade mitótica e poucos linfócitos reativos (Kempf e Mitteldorf, 2015). Infiltrado dérmico pode envolver o subcutâneo e, ocasionalmente, estende-se a uma epiderme ulcerada (Goyal et al., 2019).

Em contraste com os linfomas de células B de baixo grau, a maioria das células de LCPDGCB-TP expressa Ki67. Os marcadores BCL2 e MUM1 são expressos pela maioria de células B ativadas. FOXP1, IgM e p63 apresentam positividade em mais de 30% do infiltrado linfoide que pode auxiliar a distinguir LCPDGCB-TP de LCPCF quando necessário (Goyal et al., 2019). Muitos casos são negativos para BCL-6 e CD10, ou mostram fraca expressão destes marcadores. Redes de CDF positivas para CD21 não são encontradas (Kempf e Mitteldorf, 2015).

O rearranjo monoclonal de cadeia pesada de Ig é frequentemente presente (Goyal et al., 2019). Estudos recentes relatam expressão de MYC em 65% e de BCL2 em 90% dos casos de LCPDGCB-TP. A dupla expressão MYC e BCL2 está presente em dois terços dos casos, que pode facilitar a diferenciação entre LCPDGCB-TP e LCPCF. Rearranjo do gene MYC foi detectado em 30% dos casos com um segundo rearranjo no gene BCL6 em casos raros (Willemze et al., 2019). A hibridização in situ para pesquisa de EBV é negativa em LCPDGCB-TP e deve ser realizada para excluir linfoma difuso de grandes células associado ao vírus EBV. A maioria dos casos de LCPDGCB-TP contém a deleção 9p21.3, incluindo os loci CDKN2A e CDKN2B (Senff et al., 2009).

3.2.3.4 Linfoma intravascular de grande célula B

É uma entidade extremamente rara, frequentemente associada com envolvimento extracutâneo (sistema nervoso central e pulmão), mas também pode se apresentar como doença restrita à pele. Normalmente afeta indivíduos mais velhos (idade média de 67-70 anos) (Orwat e Batalis, 2012). O prognóstico é ruim: sobrevida global de 3 anos para 56% de pacientes com apenas lesões cutâneas e 22% para pacientes com doença generalizada (Ferreri et al., 2004).

Ocorrem 2 apresentações fenotípicas clínicas: forma asiática (com síndrome hemofagocítica e linfo-histiocitose hemofagocítica) e ocidental (com envolvimento do sistema nervoso central e cutâneo) (Orwat e Batalis, 2012). Uma variante cutânea que se apresenta com doença limitada à pele no momento do diagnóstico foi descrita. É responsável por cerca de 25% de todos os casos ocidentais e afeta predominantemente mulheres (Willemze et al., 2019).

Os achados cutâneos manifestam em aproximadamente metade dos pacientes com a forma ocidental e incluem erupção maculopapular, nódulos, placas violáceas, púrpura, úlceras, alterações do tipo *peau d'orange* ou infiltração semelhante à celulite. Distribuição dos vasos e leitos capilares envolvidos determinam os sintomas. Os pacientes geralmente apresentam sintomas constitucionais e os pacientes com envolvimento do SNC podem demonstrar déficits no sistema nervoso sensorial e motor, convulsões, perda de visão e níveis de alteração de consciência (Orwat e Batalis, 2012).

É caracterizado pelo acúmulo de células tumorais no lúmen de pequenos e médios vasos. O imunofenótipo é variável com expressão de BCL2 e MUM1 relatada na maioria dos casos e variabilidade em CD5, CD10 e BCL6 (Murase et al., 2007). Estudo de rearranjo da cadeia pesada do gene Ig pode ajudar a detectar clonalidade quando há suspeita histológica de linfoma (Goyal et al., 2019).

3.2.3.5 Úlcera mucocutânea EBV⁺

Úlcera mucocutânea EBV⁺ é também uma entidade muito rara. Acomete indivíduos imunocomprometidos (como pacientes idosos e/ou pacientes tratados com metotrexato, ciclosporina, azatioprina, ou inibidores do fator de necrose tumoral alfa). É um processo indolente, que mostra remissão completa após a suspensão dos medicamentos imunossupressores ou após a radioterapia. Caracterizada pelo desenvolvimento de ulceração solitária nitidamente demarcada com rápida evolução, envolvendo a pele, mucosa orofaríngea e o trato gastrointestinal (Dojcinov et al., 2010).

Histologicamente, as lesões contêm grandes células B EBV⁺ Hodgkin-símile com associação inflamatória. As grandes células transformadas são PAX5⁺, com expressão variável de CD20, exibem fenótipo de “não centro germinativo” (IRF4 / MUM1⁺, CD10⁻, BCL6⁻) e tipicamente expressam CD30 com coexpressão de CD15 em quase metade dos casos (Willemze et al., 2019).

3.2.4 Métodos diagnósticos

Os linfomas cutâneos primários (LCP) compreendem um grupo heterogêneo de neoplasias linfocíticas com amplo espectro de características clínicas, histológicas, imunofenotípicas e genéticas. O exame histopatológico desempenha papel essencial e é frequentemente o ponto de partida na investigação diagnóstica dos LCP.

As biópsias por punch (4-6 mm), em cunha incisional ou excisional são mais frequentemente realizadas para o diagnóstico de LCPCB. Estudo IHQ com um painel de anticorpos contra antígenos de células B incluindo CD20, CD79a, CD5, CD10, BCL-2, BCL-6, K/L e MUM1/IRF4 é uma ferramenta diagnóstica essencial. O rearranjo gênico da cadeia pesada e da cadeia leve da Ig por PCR pode ser feito em tecidos de amostra fixada em formol e incluída em parafina (AFFIP) para confirmar uma origem clonal das células B. A citometria de fluxo do tecido fresco também pode ser útil se a amostra de biópsia contiver um número suficiente de células malignas (Sokol et al., 2012).

Um exame físico completo é necessário e presença de linfonodo com 1 cm ou mais de diâmetro é considerado anormal. Linfonodos suspeitos ou envolvimento visceral devem ser investigados, realização de biópsia cirúrgica ou por agulha grossa (*core biopsy*) podem ser suficientes. Os exames laboratoriais a serem realizados incluem hemograma completo com diferencial, painel metabólico completo e DHL. Exames de imagem (PET/CT) é recomendado para avaliação dos LCPCB (Olsen, 2015).

O estadiamento é semelhante ao proposto para os LCPCT não-MF/SS pela EORTC/ISCL (*International Society for Cutaneous Lymphomas*) (Kim et al., 2007) e recentemente modificado pela EORTC/ISCL/USCLC (*United States Cutaneous Lymphoma Consortium*) (Olsen et al. 2021) (Tabela 6), com ênfase na caracterização das lesões cutâneas de acordo com tamanho e localização referente às regiões de drenagem dos linfonodos (Figura 4). Biópsia de medula óssea é necessária no LCPDGCB-TP, deve ser considerada no LCPCF e não é necessário no LCPZM. Se houver qualquer confirmação de doença extracutânea, os pacientes não são mais classificados como LCPCB, mas sim como um linfoma de células B sistêmico (Olsen, 2015).

Tabela 6 - Estadiamento de LCPCT não-MF/SS e LCPCB (EORTC/ISCL/USCLC)

Classificação TNM	Estadiamento	Localização e tamanho de lesões	
Pele (T)	T0*	Ausência de lesões clínicas suspeitas	
	T1	Lesão solitária	T1a Lesão solitária <5 cm de diâmetro
			T1b Lesão solitária ≥5 cm de diâmetro
	T2	Múltiplas lesões limitadas a 1 região corporal ou 2 regiões corporais contíguas	T2a Toda doença acomete uma área circular <15 cm de diâmetro
			T2b Toda doença acomete uma área circular de 15 a <30 cm de diâmetro
			T2c Toda doença acomete uma área circular ≥30 cm de diâmetro
	T3	Acometimento cutâneo generalizado	T3a Múltiplas lesões acometem 2 regiões corporais não contíguas
			T3b Múltiplas lesões acometem ≥3 regiões corporais
	Linfonodos (N)	N0	Nenhum acometimento nodal clínico ou patológico
N1		Acometimento de uma região de linfonodo periférico que drena a área de acometimento cutâneo ou região anterior: ** biópsia positiva para linfoma	
N2		Acometimento de 2 regiões de linfonodos	

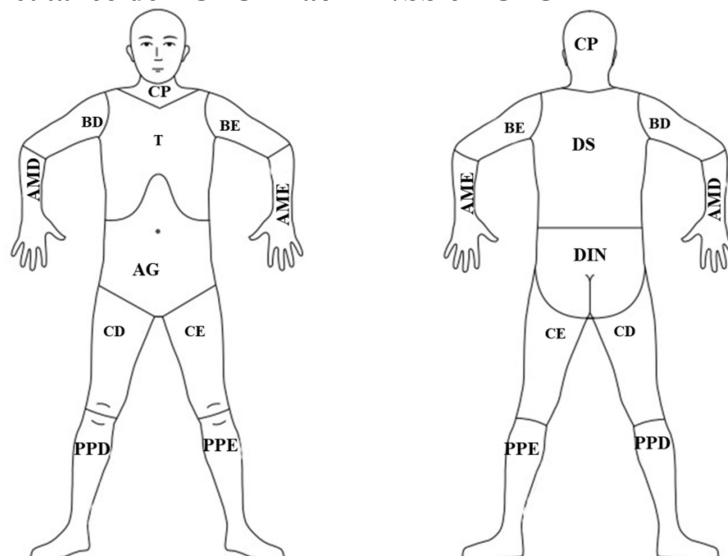
(continua)

Classificação TNM	Estadiamento	Localização e tamanho de lesões
		(continuação) periféricos ou envolvimento de qualquer região de linfonodo que não drene a área cutânea acometida ou região anterior: biópsia positiva para linfoma
	N3	Acometimento de linfonodos centrais: biópsia positiva para linfoma
	Nx	Linfonodo periférico ou central clinicamente anormal, mas sem determinação patológica. Outros meios substitutos para determinar o envolvimento podem ser determinados pelo consenso da tri-sociedade.
Viscera (M)	M0	Nenhum envolvimento visceral
	M1	Envolvimento visceral
	Mx	Envolvimento visceral não é confirmado nem refutado pela avaliação patológica ou de imagem disponível

FONTE: modificado de Olsen et al., 2021.

* T0 é usado para ensaios clínicos a fim de rastrear o desaparecimento de lesões cutâneas. Nenhum paciente com linfoma cutâneo primário no momento do diagnóstico deve ser T0. ** Ver Figura 4 para áreas corporais de drenagem linfonodal periférica. TNM: Tumor Node Metastasis, MF: micose fungoide, SS: síndrome de Sézary, LCPCT: linfoma cutâneo primário de células T/NK, LCPCB: linfoma cutâneo primário de células B.

Figura 4 - Revisão das áreas de drenagem linfonodal para determinação da classificação do acometimento cutâneo de LCPCT não-MF/SS e LCPCB



Região linfonodal *	Abreviatura	Definição das regiões corporais/ limites
cabeça e pescoço	CP	limite inferior: clavícula anterior e processo espinhoso posterior T1
tórax	T	limite superior : borda superior das clavículas; limite inferior: margem inferior da caixa torácica; limites laterais: linhas axilares médias, articulações glenoumerais (inclusive axila)
braço esquerdo	BE	limite superior : articulações glenoumerais (exclusão de axila); limite inferior : articulação ulnar/radial/umeral (cotovelo)

(continua)

Região linfonodal *	Abreviatura	Definição das regiões corporais/ limites
antebraço e mão esquerda	AME	(continuação) limite superior: articulação ulnar/radial/umeral (cotovelo)
abdome e genitália	AG	limite superior: margem inferior da caixa torácica; limite inferior: pregas inguinais, períneo anterior
coxa esquerda	CE	limite superior: pregas inguinais e glúteas; limites inferiores: metade de patela anterior e metade de fossa poplíteia posterior
perna e pé esquerdo	PPE	borda superior: metade de patela anterior e metade de fossa poplíteia posterior
braço direito	BD	limite superior: articulações glenoumerais (exclusão de axila); limite inferior: articulação ulnar/radial/umeral (cotovelo)
antebraço e mão direita	AMD	limite superior : articulação ulnar/radial/umeral (cotovelo)
coxa direita	CD	limite superior: pregas inguinais e glúteas; limites inferiores: metade de patela anterior e metade de fossa poplíteia posterior
perna e pé direito	PPD	borda superior: metade de patela anterior e metade de fossa poplíteia posterior
dorso superior	DS	limite superior: processo espinhoso T1; limite inferior: margem inferior da caixa torácica; limites laterais: linhas axilares médias.
Dorso inferior/nádegas	DIN	limite superior: margem inferior da caixa torácica; limite inferior: prega glútea inferior e períneo anterior (inclusive períneo); limites laterais: linhas axilares médias

FONTE: modificado e adaptado de Kim et al., 2007; Olsen et al., 2021.

*Baseada na classificação de Ann Arbor. MF: micose fungoide, SS: síndrome de Sézary, LCPCT: linfoma cutâneo primário de células T/NK, LCPCB: linfoma cutâneo primário de células B.

3.2.5 Tratamento dos LCPCB

Nos linfomas indolentes com doença localizada, as terapias de primeira linha geralmente são radioterapia local ou excisão cirúrgica. A eficácia dos antibióticos no caso de sorologia positiva para *B. burgdorferi* ainda é controversa. A abordagem *wait-and-see* é considerada possível pelas diretrizes da EORTC e *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN) (Dumont et al., 2020).

A taxa de resposta completa é próxima de 100% com radioterapia local, embora recaídas e eventos adversos agudos ocorram em quase metade dos casos (Gauci et al., 2018). Coortes retrospectivas auxiliaram na definição da melhor dose para reduzir a toxicidade e manter uma alta taxa de resposta. Nenhuma diferença significativa entre dose muito baixa (4–8 Gy) e dose padrão (> 24 Gy) foram encontradas por Goyal et al. (Goyal et al., 2018), mas a taxa de resposta foi significativamente menor no grupo de dose muito baixa (4 Gy) versus dose padrão (> 24 Gy, mediana de 40 Gy) em um estudo recente sobre LCPZM e LCPCF (Oertel et al., 2020). Lesões disseminadas podem ser tratadas com rituximabe intravenoso (anticorpo monoclonal anti-CD20). De acordo com a revisão da literatura por Morales et al., a duração da resposta variou de 4 a 39 meses com mediana de 14 meses para LCPCF e 9 meses

para LCPZM. A taxa de resposta completa foi maior para LCPCF (77%) do que para LCPZM (43%) (Fernández-Guarino et al., 2014). Quando as lesões são difíceis de tratar por radioterapia ou cirurgia, como face e couro cabeludo, tratamento com rituximabe intralesional pode ser considerado (Senff et al., 2008).

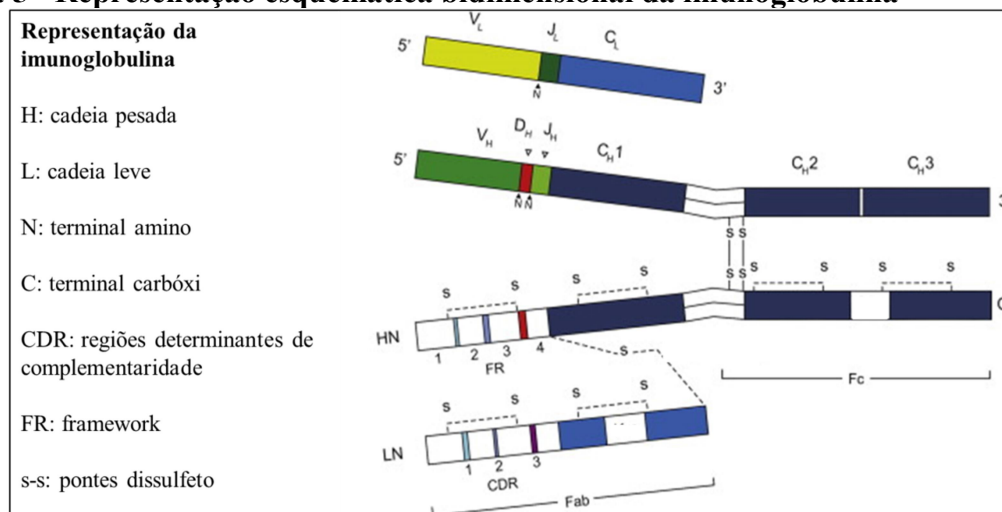
LCPDGCB-TP é um linfoma agressivo que afeta pessoas idosas e seu manejo é desafiador. Atualmente, o tratamento de primeira linha é R-CHOP (combinação de rituximabe, ciclofosfamida, doxorrubicina, vincristina e prednisona) associado ou não a radioterapia. Caso a condição do paciente não permita um tratamento tão agressivo, radioterapia local de todas lesões cutâneas visíveis ou terapia exclusiva com rituximabe podem ser consideradas (Senff et al., 2008).

3.3 Pesquisa de clonalidade pelo rearranjo gênico da imunoglobulina e TCR

3.3.1 Receptores de células B e T

As imunoglobulinas são constituídas por duas cadeias pesadas e duas cadeias leves idênticas unidas por ligações dissulfeto (Figura 5). A porção amino-terminal (N) de cada cadeia possui domínio variável que se liga ao antígeno por meio de três regiões determinantes de complementaridade (CDR). A porção carbóxi-terminal (C) das cadeias pesadas e leves formam as regiões constantes, que definem a classe e subclasse das imunoglobulinas e controlam se a cadeia leve é do tipo K ou L. A sequência de aminoácidos da região constante das cadeias pesadas especifica cinco classes de imunoglobulinas (IgG, IgA, IgM, IgD e IgE), quatro subclasses de IgG e duas subclasses de IgA. Essas classes e subclasses têm funções diferentes. Cada tipo de Ig pode ser produzida como uma molécula circulante (funcionando como um anticorpo) ou molécula estacionária (com função de receptor para o antígeno). Este último tipo tem uma estrutura transmembrana hidrofóbica que ancora a molécula na membrana da célula B, onde funciona como receptor de células B (*B-cell receptor* - BCR). Ao contrário da Ig, nas células os TCR são produzidos apenas como moléculas de estrutura transmembrana (com função de receptor para o antígeno). Consistem em heterodímeros α/β ou γ/δ ; cada cadeia α , β , γ e δ contém um domínio variável e um domínio constante. Como na molécula de anticorpo, os domínios variáveis contêm três CDR (Delves e Roitt, 2000).

Figura 5 - Representação esquemática bidimensional da imunoglobulina

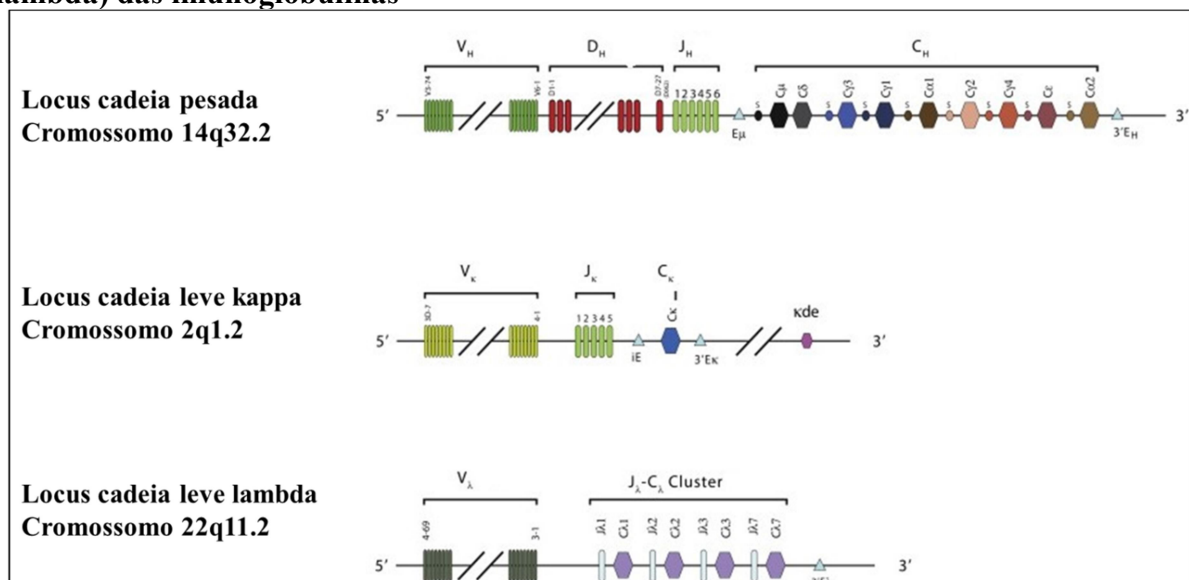


FONTE: modificado de Schroeder et al.,2010.

As imunoglobulinas são constituídas por duas cadeias pesadas e duas cadeias leves idênticas unidas por ligações dissulfeto.

Estima-se que os linfócitos sejam capazes de produzir cerca de 10^{15} diferentes regiões variáveis de imunoglobulinas (células B) e número semelhante de regiões variáveis de TCR (células T). Notavelmente, a vasta diversidade de repertório imunológico se origina de menos de 400 genes. Este resultado extraordinário é obtido por processos de recombinação que cortam, emendam e modificam genes da região variável. Os componentes genéticos que codificam as imunoglobulinas encontram-se em três cromossomos (Figura 6): locus IgH (referente à cadeia pesada de Ig) localizado no cromossomo 14, locus IgK (cadeia leve kappa de Ig) localizado no cromossomo 2 e locus IgL (cadeia leve lambda de Ig) localizado no cromossomo 22. Dentro do locus IgH ocorrem quatro tipos de segmentos gênicos: V (região variável), D (região de diversidade), J (região de junção) e C (região constante). Os loci IgK e IgL não têm segmentos D. Os genes do TCR têm uma organização semelhante e também contêm segmentos V, D, J e C (Delves e Roitt, 2000).

Figura 6 - Representação cromossômica dos loci das cadeias pesada e leves (kappa e lambda) das imunoglobulinas



FONTE: modificado de Schroeder et al.,2010.

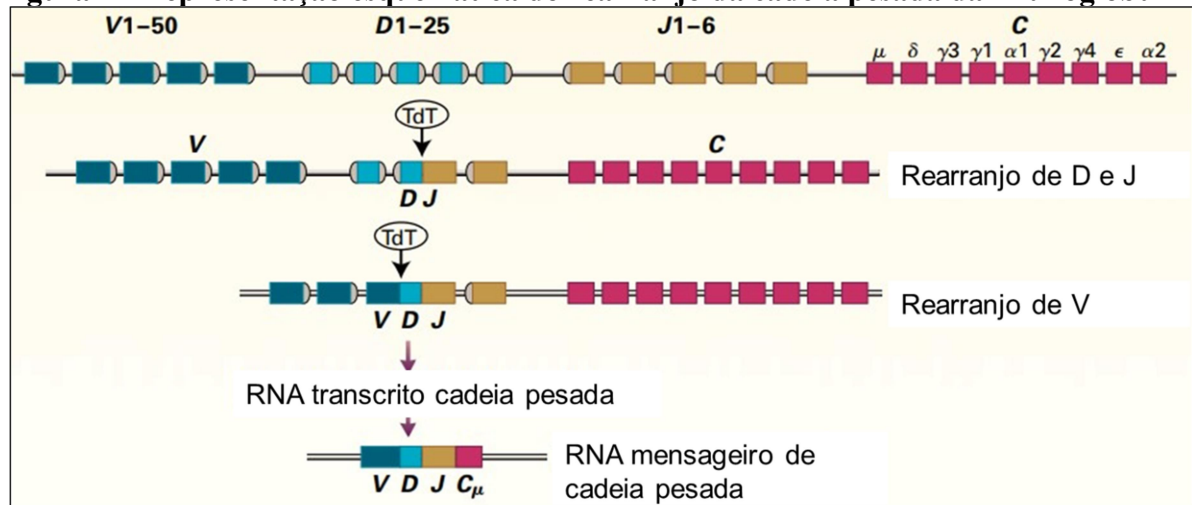
Os loci cromossômicos e componentes genéticos que codificam as imunoglobulinas.

3.3.2 Rearranjo gênico do receptor de Ig e TCR

No processo de diferenciação linfóide inicial os loci dos genes Ig e TCR contêm diferentes segmentos gênicos de região V, D e J que estão sujeitos ao processo de rearranjo. Os rearranjos V–D–J são mediados pelo complexo enzimático recombinase em que as proteínas RAG1 e RAG2 desempenham um papel fundamental ao reconhecer e cortar o DNA nas sequências do sinal de recombinação. O processo de rearranjo geralmente começa com rearranjo de D para J seguido por um rearranjo V para D–J na IgH (Figura 7) e nos genes de TCR beta (TCR β) e TCR delta (TCR δ); ou no rearranjo direto V-J em IgK, IgL, TCR alfa (TCR α) e TCR gama (*T-cell receptor gamma* - TCR γ). O rearranjo gênico de Ig e TCR durante o período de diferenciação linfóide inicial segue uma ordem hierárquica. Durante a diferenciação de células B, primeiro os genes IgH se reorganizam, depois IgK, potencialmente resultando na expressão de IgH/K. Ou seguido por deleção de IgK e rearranjo de IgL, potencialmente seguido pela expressão IgH/L. Isso implica que praticamente todas as células B com rearranjo de IgL apresentam deleções monoalélicas ou bialélicas do gene IgK. Durante a diferenciação da célula T, primeiro ocorre rearranjo dos genes TCR δ , seguido de TCR γ , potencialmente resultando na expressão de TCR $\gamma\delta$. Ou seguido pelo rearranjo de TCR β e exclusão de TCR δ com subsequente rearranjo de TCR α , potencialmente seguido pela expressão de TCR $\alpha\beta$. Os padrões de rearranjo de genes de Ig e TCR em neoplasias linfóides geralmente seguem esta ordem de hierarquia descrita, embora padrões de rearranjo incomuns possam ser encontrados particularmente em leucemias linfoblásticas agudas (van Dongen et al., 2003).

Os linfócitos B maduros estendem ainda mais o repertório de Ig após reconhecimento de antígenos em centros germinativos via hipermutação somática (HSM), um processo que leva à maturação de afinidade das moléculas de Ig. O processo de HSM concentra-se no exon V (D) J dos genes de cadeias pesada e leves e ocorre através de mutações de nucleotídeo único e inserções ou deleções ocasionais de nucleotídeos. Portanto, genes de Ig com mutação somática são encontrados em malignidades de células B maduras do centro germinativo ou originadas do centro pós-germinativo (van Dongen et al., 2003).

Figura 7 - Representação esquemática do rearranjo da cadeia pesada da imunoglobulina



FONTE: adaptado de Delves et al., 2000.

O processo de rearranjo inicia-se com o rearranjo de D para J seguido pelo rearranjo V para D-J na cadeia pesada da imunoglobulina. A diversidade de repertório imunológico ocorre pelo rearranjo aleatório de 1 entre 25 segmentos gênicos de diversidade (D) associado a qualquer 1 dos 6 segmentos gênicos de junção (J). Seguido pelo rearranjo de qualquer 1 dos 50 segmentos gênicos variáveis (V) associado ao segmento DJ já reorganizado. Diversidade adicional ocorre pela incorporação de nucleotídeos mediada pela enzima desoxirribonucleotidiltransferase terminal (TdT). O transcrito de RNA primário de cadeia pesada é processado em RNA mensageiro.

3.3.3 Pesquisa de clonalidade pela pesquisa de rearranjo gênico da Ig e TCR

Estudos de rearranjos gênicos funcionam como ferramentas diagnósticas úteis para leucemias e linfomas, e também como marcadores moleculares de células tumorais derivadas de expansão clonal dos linfócitos B (Abbas et al., 2014). A análise molecular de clonalidade baseia-se no fato de que, em princípio, todas as células de uma neoplasia maligna têm uma origem clonal comum e demonstram rearranjo clonal (idêntico) dos genes de Ig (Fan e Robetorye, 2013). O diagnóstico de proliferações malignas de células B é portanto, apoiado pelo achado de clonalidade do gene de Ig, enquanto que linfoproliferações reativas mostram genes de Ig com rearranjo policlonal (Cossman et al., 1991; Langerak et al., 2001). As cadeias pesada e leves de Ig apresentam rearranjo clonal em linfomas (baixo, intermediário e alto grau) e leucemias (Cossman et al., 1991; Aisenberg, 1993; Noor Haslina et al., 2013).

A pesquisa do rearranjo gênico é realizada utilizando-se o método de Southern blot ou reação em cadeia da polimerase (PCR). A análise de SB foi utilizada inicialmente, porém recentemente a PCR substituiu esta técnica. As vantagens dos ensaios de PCR em relação ao

SB são: PCR é mais sensível do que SB, utilização de quantidades menores de DNA e parcialmente degradado, além de possibilidade de realização em AFFIP (Hughes et al., 2001).

No entanto, a sensibilidade e especificidade das diferentes técnicas de PCR diferem por causa da ligação ineficaz de *primers*, especialmente na HSM que são comuns no LCP. Resultados falsos positivos são comuns especialmente em tecido extranodal (por exemplo, pele) pois apenas pequenas quantidades de células B malignas podem estar presentes; isto é especialmente verdadeiro se a amostra é analisada apenas uma vez. Em tais situações, análises repetidas podem auxiliar na avaliação de pseudomonoclonalidade (Felcht et al., 2011).

Linfócitos B produzem diversos anticorpos através do mecanismo de rearranjo do gene da Ig e HSM. O gene de IgH consiste em três CDR e três regiões de estruturas conservadas (*FR/framework*) intercaladas entre si. O sítio de ligação ao antígeno, conhecido como CDRIII, é a região mais variável do gene IgH rearranjado. Uma vez que os genes do receptor do antígeno são polimórficos (relacionado com população heterogênea de sequências de DNA), é difícil empregar um único conjunto de sequências de *primers* de DNA para direcionar todas as regiões alvo em torno do rearranjo V-J. A diversidade da região terminal N e ocorrências de mutação somática aumentam ainda mais a variedade de sequências de DNA nessas regiões. Portanto, *primers* multiplex com alvo para vários FR, são necessários para identificar a maioria dos rearranjos clonais (Abbas et al., 2014).

Em 2003, BIOMED-2 (protocolo BMH4 CT98-3936) foi desenvolvido por um grupo de estudo colaborativo que reuniu vários institutos de 7 países europeus no desenvolvimento e padronização de protocolos de *primers* de PCR para detecção de rearranjo gênico de Ig e TCR; assim como diretrizes para interpretação dos resultados (Felcht et al., 2011). Foi observado aumento expressivo na detecção de rearranjos clonais. Ao utilizar 107 *primers* diferentes em apenas 18 tubos de PCR multiplex, é possível detectar virtualmente todas as proliferações clonais de células B e T (Deonizio e Guitart, 2012). Assim é considerado de alta sensibilidade e especificidade, pois avalia quase todos os possíveis rearranjos gênicos da Ig. Avalia rearranjos VH-JH dos genes IgH (tubos A, B e C), DHJH dos genes IgH (tubos D e E), rearranjos do gene Igk (tubo A: VK-JK; tubo B: VK/intron-Kde) e rearranjos do gene IgL (tubo V λ -J λ). Desta forma atua em todas essas regiões, com ação de oligonucleotídeos em todo potencial de variabilidade dos rearranjos (Felcht et al., 2011). O consórcio que iniciou o

grupo de estudo BIOMED-2, atualmente mantém a colaboração sob o nome de EuroClonality (Langerak et al., 2012).

Uma vez que neoplasias de células B contêm genes de IgH reorganizados de forma idêntica, *primers* de PCR com alvo em FR têm a capacidade de detectar população de células B monoclonais tanto em forma de banda em eletroforese de gel ou pico agudo em sequenciador de fragmentos de DNA. Entre os vários testes de PCR baseados em DNA, o BIOMED-2 utiliza três conjuntos de *primers* denominados FR1, FR2 e FR3 no estudo de IgH; e tornou-se o método de laboratório mais comumente utilizado (Xu et al., 2015). O valor deste protocolo foi demonstrado na avaliação de malignidades sistêmicas de células B e de células T em grandes estudos multicêntricos. Recentemente, foi demonstrado que o BIOMED-2 pode diferenciar entre infiltrados linfóides benignos na pele e LCPCF, assim como LCPZM; entretanto a sensibilidade difere nos subgrupos de LCPCB e entre os estudos (Felcht et al., 2011).

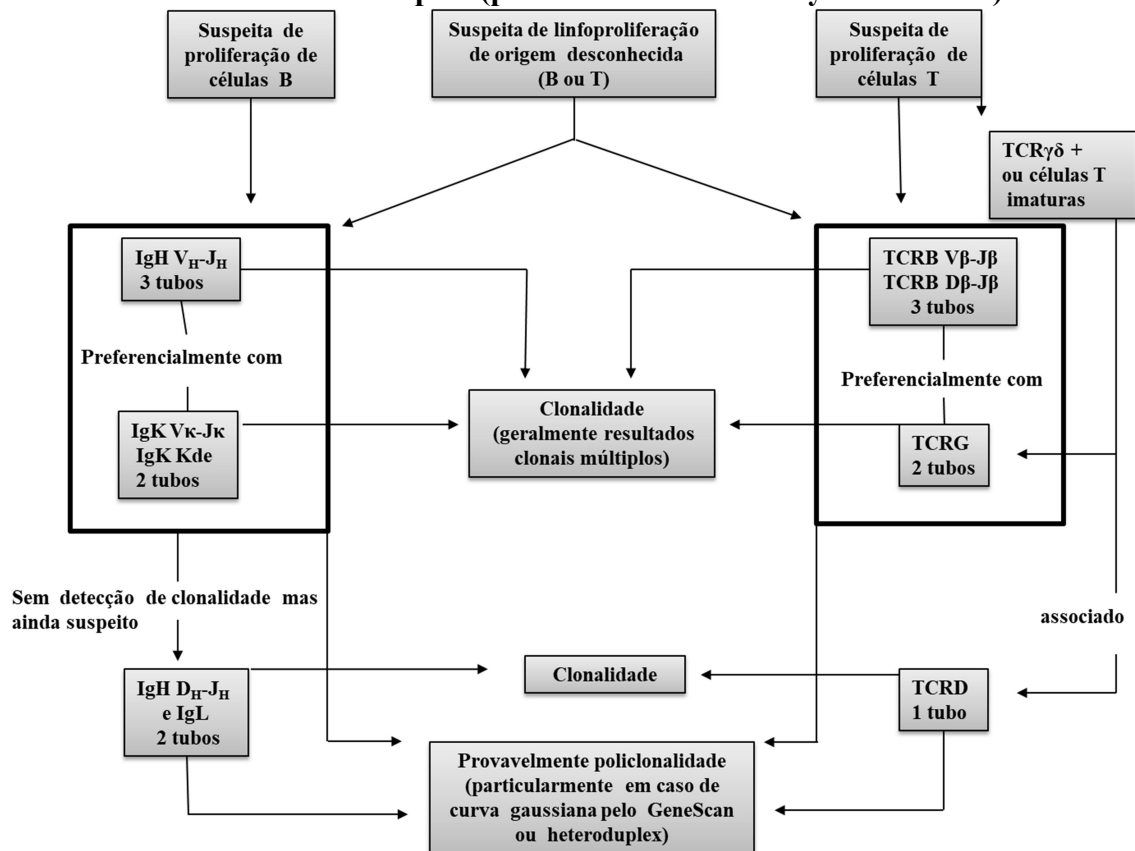
Os produtos de PCR são analisados por diferentes técnicas. Na maioria dos métodos convencionais de PCR, a monoclonalidade é definida pela presença de uma banda discreta após eletroforese em gel dos produtos de PCR (Deonizio e Guitart, 2012). Mas a eletroforese capilar de alta resolução, em particular associação com a análise de fragmento de fluorescência em sequenciadores de DNA automatizados, é recomendado pela vantagem de fornecer o tamanho exato de 1 bp de cada amplicon em comparação com outras técnicas de eletroforese (Lukowsky et al., 2006). Assim permite uma medição precisa de pares de bases dos produtos de PCR, e fornece a identificação do clone celular (Deonizio e Guitart, 2012). Os rearranjos de genes monoclonais são identificados se um ou dois picos proeminentes estiverem presentes em pelo menos um tubo de PCR (Lee et al., 2016).

O rearranjo dos genes de IgH é o primeiro evento de rearranjo a ocorrer na diferenciação de células B e está presente na maioria dos LCPCB (Van Der Burg et al., 2001). Como várias regiões (FR1, FR2 e FR3) de genes de IgH podem ser avaliados, vários protocolos foram desenvolvidos (Diss et al., 1994; Nihal et al., 2000) com destaque para o protocolo BIOMED-2 (van Dongen et al., 2003). A sensibilidade pode variar de menos de 20% a mais de 90%, a depender do método empregado (Bagg et al., 2002; Nikiforova et al., 2007). Em alguns casos, não é possível amplificar o gene IgH devido falha de ligação dos *primers* ao rearranjo que ocorreu nos linfócitos B neoplásicos ou amostra de DNA

inadequada. Resultados falso negativos podem ocorrer especialmente em casos de HSM da região variável do gene de IgH devido dificuldade de anelamento dos *primers* no segmento do gene IgH rearranjado. Os rearranjos dos genes IgK e IgL também podem ser investigados e aumentam a sensibilidade diagnóstica em até 93%, particularmente quando combinada com análise do gene de IgH (Gong et al., 1999; Diss et al., 2002; Melotti et al., 2010).

Um algoritmo de seleção de *primers* foi proposto conforme população celular suspeita (Figura 8). Em caso de suspeita de clonalidade de células B, geralmente o três alvos FR de IgH são indicados, em paralelo ou seguidos pela pesquisa do rearranjo dos genes de IgK. Embora o uso consecutivo de IgH seguido de IgK possa ser uma abordagem mais econômica, a pesquisa simultânea do rearranjo de IgH e IgK pode ser mais eficiente pelo ganho de tempo diagnóstico, tanto para o clínico quanto para o paciente. Mesmo que a pesquisa do rearranjo referente aos genes IGH V-J e IgK seja suficiente na maioria dos casos (>95%), a avaliação dos alvos IGH D-J e IgL pode ser ocasionalmente útil como abordagem de segunda linha (Langerak et al., 2012).

Figura 8 - Algoritmo para diagnóstico de clonalidade em suspeita de linfoproliferações com diagnóstico inconclusivo ou histologia, imunofenótipo ou apresentação clínica incomuns baseado no PCR multiplex (protocolo EuroClonality/BIOMED-2)



FONTE: adaptado de Langerak et al., 2012.

Em caso de suspeita de proliferação de células B, a análise de PCR multiplex IgH VH – JH é a abordagem inicial. Como uma segunda etapa, a análise de IgK (rearranjos Vκ-Jκ e Kde) pode ser realizada. De preferência, essas duas etapas são combinadas. A análise de IgH DH-JH e IgL pode ser reservada para os demais casos suspeitos, nos quais os ensaios de PCR anteriores não conseguiram detectar monoclonalidade e também não mostraram evidência de policlonalidade. Para suspeita de proliferação de células T, PCR multiplex de TCRB é geralmente mais informativo do que o TCRG, mas os dois alvos devem ser usados em paralelo. Apenas em caso de suspeita de proliferação de células T e células T imaturas proliferações TCRγδ⁺, é preferível a análise combinada de TCRG e TCRD. Em caso de suspeita de linfoproliferações de origem desconhecida, ambos os genes Ig e TCR, devem ser usados como alvos de PCR. TCRB: TCR beta; TCRD: TCR delta, TCRG: TCR gamma

A sensibilidade global dos métodos baseados em PCR para a detecção de clonalidade de células T varia aproximadamente entre 70% e 90%, com especificidade variável conforme população da amostra. População clonal que represente de 0,001% até 1,0% do infiltrado pode ser detectada pelo PCR. Outras características conferem maior aplicabilidade ao método, como: velocidade, menor quantidade necessária de DNA e novas técnicas permitindo a extração suficiente de DNA de tecido proveniente de AFFIP. O teste amplifica o DNA

extraído ao utilizar *primers* direcionados contra o TCR beta, cadeias gama e delta. O gene da cadeia gama é o mais comumente utilizado por causa da menor complexidade do genoma, com limitado número de segmentos V e J, e ausência de segmentos D, e exige, portanto, menos *primers* específicos e um produto de PCR ideal acima de 400 bp (pares de base) (Deonizio e Guitart, 2012).

A análise de clonalidade através de PCR tem desenvolvido um importante papel diagnóstico em LCPCB, mas apropriados protocolos devem ser selecionados e otimizados para garantir os benefícios da sensibilidade diagnóstica destas técnicas. A qualidade de DNA nas amostras é de importância crucial e as biópsias de pele são notoriamente pobres nesse aspecto. O processo de AFFIP danifica o DNA por fragmentação ou outros mecanismos, e pode prejudicar a sensibilidade do teste pela dificuldade de amplificação de fragmentos de DNA (van Dongen et al., 2003; Zsikla et al., 2004; Melotti et al., 2010).

4.CASUÍSTICA E MÉTODOS

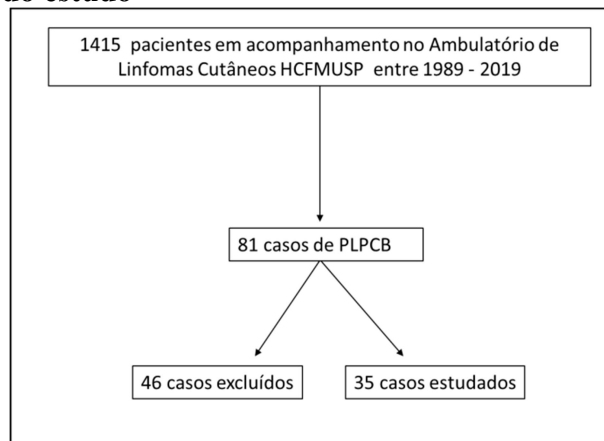
4.1 Casuística

Foram inicialmente selecionados 81 pacientes com diagnóstico de PLPCB da casuística do Ambulatório de Linfomas Cutâneos da Divisão de Clínica Dermatológica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo registrados no período compreendido entre 1989 e 2019 (Figura 9). Os pacientes selecionados apresentavam quadros clínico-patológicos e fenotípicos de PLPCB com possibilidades diagnósticas de PLC ou LCPCB, com as seguintes características:

- a) diagnóstico definitivo de pseudolinfoma cutâneo;
- b) possibilidade diagnóstica de pseudolinfoma cutâneo ou linfoma cutâneo de células B, não sendo possível a diferenciação entre ambos através de critérios clínicos-evolutivos, histopatológicos e imuno-histoquímicos;
- c) diagnóstico estabelecido de linfomas cutâneos de células B.

O estudo foi desenvolvido no período de 2017 a 2021. Dentre os 81 pacientes selecionados, foram estudados 35 pacientes e os demais 46 pacientes foram excluídos (Figura 9). Os critérios de exclusão foram pacientes com materiais de biópsia de pele indisponíveis, blocos de parafina com materiais insuficientes ou com qualidade prejudicada.

Figura 9 - Casuística do estudo



PLPCB: Processos linfoproliferativos cutâneos de células B

Caracterizou-se pela revisão de prontuários, reavaliação histopatológica, revisão imuno-histoquímica e pesquisa de clonalidade em material proveniente de biópsias cutâneas (maioria já realizadas). Em todos os casos foram utilizados materiais de biópsias cutâneas provenientes de AFFIP, mas em 11 casos também foram utilizadas amostras congeladas (AC) a - 20°C.

Foi obtido aprovação pelo Comitê de Ética do HCFMUSP e todos os participantes que foram submetidos a nova biópsia cutânea assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

4.2 Métodos

4.2.1. Avaliação de dados gerais e demográficos

Os dados foram obtidos mediante revisão de prontuários com coleta de informações clínicas, demográficas e laboratoriais dos pacientes. Informações referentes ao quadro clínico, como história, data da primeira consulta e tempo de história progressiva da doença atual foram consideradas. Foram descritas as comorbidades e outras neoplasias antecedentes. As lesões cutâneas foram caracterizadas quanto à morfologia e localização. Foram obtidos dados demográficos como sexo, idade na ocasião do diagnóstico e raça/cor. Quanto aos exames laboratoriais e de imagem, foram avaliados: hemograma completo, dosagem sérica de desidrogenase láctica (DHL), exames de imagem (radiografia, tomografia, ultrassom ou PET-CT), sorologias para HTLV, HIV e Borrelia. Os dados foram registrados em um instrumento especificamente desenhado para este fim (Apêndice A).

4.2.2 Avaliação de dados clínico-evolutivos, histopatológicos, imuno-histoquímicos e de clonalidade

Os pacientes estudados foram submetidos a um protocolo de investigação diagnóstica (PID) proposto especificamente para este estudo. Os critérios utilizados foram baseados nas avaliações detalhadas a seguir:

- a) avaliação clínica-evolutiva;
- b) revisão histopatológica associada a estudo imuno-histoquímico;
- c) pesquisa de clonalidade pela análise do rearranjo gênico da Ig (PCR multiplex) através do protocolo BIOMED-2/ EuroClonality.

4.2.2.1 Avaliação clínica-evolutiva

Os dados clínico-evolutivos foram avaliados por três dermatologistas independentes (ABG, DRM e JAS) mediante análise dos dados obtidos pela revisão de prontuários e fotografias seriadas durante o seguimento dos casos estudados.

O critério clínico foi avaliado pelo aspecto clínico (não sugestivo, duvidoso ou sugestivo de linfoma) através da revisão dos quadros clínicos por fotografias, e definido pelos autores como detalhado a seguir:

- a) aspecto clínico “não sugestivo” foi considerado na presença de lesões:
 - isoladas ou miliariformes difusas;
 - menores de 1 cm;
 - não infiltradas
 - não ulceradas;
- b) aspecto clínico “sugestivo” de linfoma foi considerado na presença de:
 - placas infiltradas, nódulos infiltrados, tumores ou ulceração;
 - coloração eritematosa ou eritemato-violácea;
 - bordas mal definidas;
 - localização principalmente em couro cabeludo, face, tronco, membros superiores e pernas;
- c) aspecto clínico “duvidoso” foi considerado quando não preencheu critérios para sugestivo ou não sugestivo.

Aos resultados do critério clínico foram atribuídas as seguintes pontuações: não sugestivo (zero), duvidoso (um ponto) e sugestivo de linfoma cutâneo (dois pontos) conforme Tabela 7.

Tabela 7 - Avaliação do critério clínico pelo protocolo de investigação diagnóstica proposto para o estudo de processos linfoproliferativos cutâneos de células B

Avaliação	Resultados	Pontuações
Critério clínico	Aspecto clínico não sugestivo de linfoma cutâneo	0
	Aspecto clínico duvidoso de linfoma cutâneo	1
	Aspecto clínico sugestivo de linfoma cutâneo	2

A evolução foi avaliada pelo critério evolutivo quanto possibilidade de: regressão espontânea após abordagem diagnóstica (biópsia) durante o seguimento, persistência do quadro pós tratamento, recidiva, novas lesões a despeito do tratamento ou disseminação extracutânea.

Aos resultados do critério evolutivo foram atribuídas as seguintes pontuações: regressão espontânea após abordagem diagnóstica (biópsia) durante o seguimento (um ponto negativo), persistência do quadro pós tratamento (um ponto), recidiva (dois pontos), novas lesões a despeito do tratamento (três pontos) e disseminação extracutânea (seis pontos), conforme Tabela 8.

Os resultados dos critérios clínicos e evolutivos foram correlacionados à escala de pontuação numérica com diferencial de um ponto entre os diferentes achados, de acordo com maior possibilidade de associação com o diagnóstico de linfoma cutâneo. As exceções ocorreram tanto na atribuição da menor pontuação (um ponto negativo) na ocorrência de regressão espontânea após biópsia (menor associação com o diagnóstico de linfoma e maior correlação com processo reacional/benigno) quanto da maior pontuação (seis pontos) na ocorrência de evolução com disseminação extracutânea (linfonodal/visceral) pela inquestionável associação com o diagnóstico de linfoma entre os demais aspectos avaliados.

Tabela 8 - Avaliação do critério evolutivo pelo protocolo de investigação diagnóstica proposto para o estudo de processos linfoproliferativos cutâneos de células B

Avaliação	Resultados	Pontuações
Critério evolutivo	Evolução com regressão espontânea após abordagem diagnóstica (biópsia)	-1
	Evolução com persistência do quadro pós tratamento	1
	Evolução com recidiva	2
	Surgimento de novas lesões a despeito do tratamento	3
	Evolução com disseminação extracutânea	6

A associação dos resultados dos critérios clínicos e evolutivos com as respectivas pontuações foi estabelecida na definição da pontuação final do critério clínico-evolutivo (CE). Na avaliação final do critério clínico-evolutivo, foram considerados os seguintes resultados e pontuações: não compatível com linfoma (um ponto negativo ou zero), indeterminado (um a dois pontos), suspeito (três a cinco pontos) ou compatível com linfoma (maior ou igual a seis pontos), conforme detalhado na Figura 10 e Tabela 9.

Figura 10 - Pontuação final da associação dos critérios clínicos e evolutivos pelo protocolo de investigação diagnóstica proposto para o estudo de processos linfoproliferativos cutâneos de células B

Critério clínico (escores) \ Critério evolutivo (escores)	Não sugestivo de linfoma cutâneo (0)	Duvidoso (1)	Sugestivo de linfoma cutâneo (2)
Regressão espontânea após biópsia (-1)	-1	0	1
Persistência do quadro pós tratamento (1)	1	2	3
Recidiva (2)	2	3	4
Novas lesões a despeito do tratamento (3)	3	4	5
Disseminação extracutânea (6)	6	7	8

Interpretação da pontuação final do critério clínico-evolutivo (somatório dos escores do critério clínico e critério evolutivo)





-  → Pontuação -1 ou zero: não compatível com linfoma cutâneo
-  → Pontuação 1 a 2 : indeterminado
-  → Pontuação 3 a 5 : suspeito de linfoma cutâneo
-  → Pontuação ≥6: compatível com linfoma cutâneo

Tabela 9 - Avaliação do critério clínico-evolutivo pelo protocolo de investigação diagnóstica proposto para o estudo de processos linfoproliferativos cutâneos de células B

Avaliação	Resultados	Pontuações
Critério clínico-evolutivo	Não compatível com linfoma cutâneo	-1 ou 0
	Indeterminado	1 a 2
	Suspeito de linfoma cutâneo	3 a 5
	Compatível com linfoma cutâneo	≥ 6

4.2.2.2 Avaliação histopatológica e imuno-histoquímica

4.2.2.2.1 Revisão histopatológica

O material correspondente às biópsias cutâneas foi resgatado dos arquivos do laboratório de Dermatopatologia da Divisão de Clínica Dermatológica do HCFMUSP.

O estudo histopatológico (HP) foi realizado através de secções histológicas consecutivas dos espécimes cutâneos fixados em formol e incluídos em parafina, além de corados com hematoxilina e eosina (HE).

Posteriormente as lâminas dos fragmentos de pele foram revisadas por patologista (MCZ) e dermatologista (ABG), preenchendo-se as planilhas com os critérios histopatológicos relevantes e definidos previamente (Apêndice B). Os seguintes critérios, relativos as células (linfoides) de interesse, foram considerados:

- a) intensidade do infiltrado celular: discreto/leve, moderado ou intenso;
- b) distribuição do infiltrado: difuso, nodular, focal (perianexial ou perivascular) ou intersticial /dissecção de colágeno;
- c) extensão do infiltrado: presente ou ausente em derme superior, derme média, derme profunda ou hipoderme/subcutâneo;
- d) zona de Grenz: presente ou ausente;
- e) tamanho das células: presença de pequenas, médias ou grandes células;
- f) componente inflamatório associado: presença ou ausência de neutrófilos, eosinófilos, plasmócitos , histiócitos ou linfócitos T;
- g) epidermotropismo: presente ou ausente;
- h) foliculotropismo: presente ou ausente;
- i) atipia celular: leve, moderada, intensa ou ausente;
- j) invasão vascular: presente ou ausente;
- k) invasão/destruição de anexos cutâneos: presente ou ausente;
- l) mitose: presente, ausente ou atípica;
- m) ulceração de epiderme: presente ou ausente;
- n) apoptose: presente ou ausente;
- o) necrose de infiltrado: presente ou ausente;
- p) folículos linfoides: ausentes, raros ou frequentes;
- q) centros germinativos: ausentes, raros ou frequentes;
- r) zonas do manto: ausentes, raras ou frequentes.

No caso do paciente possuir múltiplas biópsias, foi selecionada para a avaliação semiquantitativa e exames complementares a amostra mais representativa, dentre aquelas realizadas antes de qualquer tipo de tratamento.

4.2.2.2.2 Revisão imuno-histoquímica

O estudo imuno-histoquímico (IHQ) foi realizado através de lâminas já confeccionadas anteriormente durante a investigação dos pacientes no período que estes estavam sob acompanhamento ambulatorial. E para os imunomarcadores adicionais segundo o protocolo do estudo, novas lâminas foram produzidas, utilizando-se o material armazenado incluído em parafina.

Em todos os casos selecionados, foi utilizado painel básico com os seguintes anticorpos: CD20, CD3, CD10, CD 21, CD23, BCL2, BCL6 e KI67. Foram utilizadas na maioria das vezes as lâminas já existentes no arquivo, e outras vezes lâminas confeccionadas recentemente. Assim, houve variação da técnica de imuno-histoquímica com utilização mais recente do método automatizado e mais remotamente a técnica manual convencional; com múltiplas características de antígenos, clones e marcas dos anticorpos utilizados. Alguns pacientes apresentaram painel imuno-histoquímico complementar de acordo com as particularidades dos casos.

As lâminas foram revisadas por patologista (MCZ) e dermatologista (ABG). Foram estabelecidos critérios IHQ de avaliação (Apêndice C) baseando-se no protocolo semiquantitativo para avaliação da marcação nas células de interesse (Tabela 10).

Tabela 10 - Protocolo semiquantitativo para avaliação imuno-histoquímica do proposto estudo

Resultado	Pontos	Interpretação
Negativo	0	Nenhuma marcação nas células de interesse
Positivo (1+/4)	1	Marcação em até 25% das células de interesse
Positivo (2+/4)	2	Marcação de 26 a 50% das células de interesse
Positivo (3+/4)	3	Marcação de 51 a 75% das células de interesse
Positivo (4+/4)	4	Marcação em mais de 75% das células de interesse

Ao final da revisão, fez-se a impressão diagnóstica histopatológica associada a imuno-histoquímica a partir dos achados obtidos e correlação com escala de pontuações. Foram considerados os seguintes resultados: não compatível com linfoma/benigno (pontuação zero), indeterminado (um ponto) ou compatível com linfoma/maligno (dois pontos), disponibilizados em Tabela 11.

Tabela 11 - Avaliação do critério histopatológico associado ao imuno-histoquímico pelo protocolo de investigação diagnóstica proposto para o estudo de processos linfoproliferativos cutâneos de células B

Avaliação	Resultados	Pontuações
Critério histopatológico e imuno-histoquímico	Não compatível com linfoma/benigno	0
	Indeterminado	1
	Compatível com linfoma/maligno	2

4.2.3 Pesquisa de clonalidade pela análise do rearranjo gênico da Ig e TCR γ

O estudo da clonalidade para células B foi realizado através da pesquisa do rearranjo dos genes da cadeia pesada (IgH) e das cadeias leves de Ig (IgK e IgL). A pesquisa da clonalidade de células T foi realizada pelo estudo do rearranjo dos genes do TCR γ . Em ambos, utilizou-se o método de PCR de acordo com protocolos descritos abaixo. Os materiais de biópsias cutâneas prévias foram avaliados através de cortes histológicos provenientes de AFFIP e/ou AC a - 20°C.

4.2.3.1 Extração do DNA

Cinco cortes histológicos de 5 μ m foram obtidos em micrótomo com lâmina virgem do material proveniente de biópsia cutânea (AFFIP) dos doentes a serem estudados. O material foi armazenado em microtubos (2,0 mL) de Eppendorf livre de DNase e RNase. Posteriormente encaminhado para processamento no Laboratório de Investigação Médica em Genética e Hematologia Molecular do HCFMUSP (LIM 31). Foram realizados cortes de 25 mg de tecido dos fragmentos de pele que estavam armazenados e congelados a - 20 ° C no LIM 31. Os cortes foram submetidos ao protocolo para desparafinação conforme descrito a seguir:

Para a extração de DNA de tecidos provenientes de AFFIP, 1 mL de Xilol PA (Invitrogen, Califórnia, EUA) foi adicionado em cada amostra, estas foram homogeneizadas em vórtex por 15 segundos e centrifugadas a 20.000 g por 5 minutos. Após a remoção do xilol, o pellet foi lavado duas vezes com 1,5 mL de etanol absoluto por 5 minutos a 20.000 g. Após cada lavagem o sobrenadante foi descartado. O pellet celular foi então incubado a 37 °C por no mínimo 15 minutos ou até a evaporação total do etanol. Os próximos passos da extração foram realizados conforme protocolo de extração de DNA de tecidos do Kit de extração de DNA, QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Alemanha). As amostras foram ressuspensas em 30 µL de tampão AE.

Para a extração de DNA de pele, cortes de 25 mg de tecido foram acondicionados em microtubos de 1,5 mL seguidos da adição de 200 uL de tampão ATL e 20 uL de proteinase K. Esta solução foi incubada a 56 °C a 500 rpm por 16 horas em agitador térmico “thermoMixer” (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) e, posteriormente, centrifugada a 6000 x g por 1 minuto para remoção de gotas do interior do microtubo. Após esta etapa, foi adicionado à solução 200 uL de tampão AL, seguida de homogeneização por 15 segundos em vortex e incubada a 70 °C por 10 minutos em agitador térmico “thermoMixer”. Após a adição de 200 uL de etanol absoluto, o protocolo foi realizado conforme protocolo de extração de DNA.

Após a realização do protocolo de extração do DNA, os produtos foram encaminhados para amplificação por PCR.

4.2.3.2 PCR Multiplex para análise de clonalidade em células B

Para a realização dos ensaios de clonalidade de células B foram utilizados os kits IgH e IgK *B-Cell Clonality Assay for ABI Fluorescence Detection* (Invivoscribe, referência 1-100-0031) e IgL *Gene Clonality Assay for ABI Fluorescence Detection* (Invivoscribe, referência 1-103-0011). A avaliação de IgH ocorreu através da análise realizada nos tubos A (alvo FR1VH-JH) , B (alvo FR2 VH-JH) e C (alvo FR3 VH-JH). A avaliação de IgK ocorreu através da análise em dois tubos (tubo A com alvo VK-JK e tubo B com alvo VK-Kde + intron-Kde) e um tubo em relação a IgL (tubo A com alvo Vλ-Jλ).

As reações em cadeia da polimerase (PCR) foram realizadas conforme manual do fabricante. Para cada reação foram utilizados 22,25 µL de master mix, 0,25 µl de AmpliTaq Gold (Applied Biosystems, referência N808-0241) e 2,5 µL de DNA com concentração variando entre 15 e 25 ng, totalizando 25 µL de volume de reação. As reações foram realizadas em paralelo com os respectivos controles positivos, negativos e controle sem DNA. Após a PCR, as amostras foram submetidas à técnica de sequenciamento.

4.2.3.3 PCR Multiplex para análise do rearranjo dos genes receptores TCR γ

Para cada reação da PCR multiplex foram utilizados 1,25 µL de 10x buffer, 0,375 µL de MgCl₂ a 50 mM, 0,25 µL de DNTP a 10 mM, 0,5 µL de cada um dos 7 oligonucleotídeos (IDT, Iowa, EUA) a 10 pmol/µL, 0,2 µL (1 U) de Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Califórnia, EUA), 5,4 µL de água ultrapura e 1,5 uL de DNA. Para amplificação dos produtos da PCR, foi utilizado o termociclador Veriti (Applied Biosytem, Foster City, CA) nas seguintes condições: 1 ciclo a 94 °C por 3 min, 40 ciclos a 95 °C por 1 min/61,8 °C por 30 seg/72 °C por 30 seg, 1 ciclo a 72 °C por 10 min e um ciclo a 4 °C ∞ até a retirada das reações do termociclador. Após a PCR, as amostras foram submetidas à técnica de sequenciamento.

4.2.3.4 Eletroforese capilar de fragmentos e sequenciamento

Para o sequenciamento, o produto da PCR foi diluído 1:5 e 1 µL foi adicionado a uma mistura contendo 8,5 µL de formamida (Applied Biosytem, Califórnia, EUA) e 0,5 µL de GeneScan Rox (Applied Biosytem, Califórnia, EUA), totalizando 10 µL. As misturas foram acomodadas em placa de 96 poços específicas para sequenciador ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosytem, Califórnia, EUA) e submetidas as seguintes condições de injeção: 8 segundos de injeção, voltagem de pré-corrída 19,5 kV, voltagem de injeção 1,6 kV, dye set D, polímero POP-7, temperatura do forno 60 °C. Os dados foram analisados utilizando GeneMapper Software v4.1 (Applied Biosytem, Califórnia, EUA) e a monoclonalidade foi determinada por exame visual dos eletroferogramas utilizando o software GeneMapper v4.1 (Applied Biosytem, Califórnia, EUA).

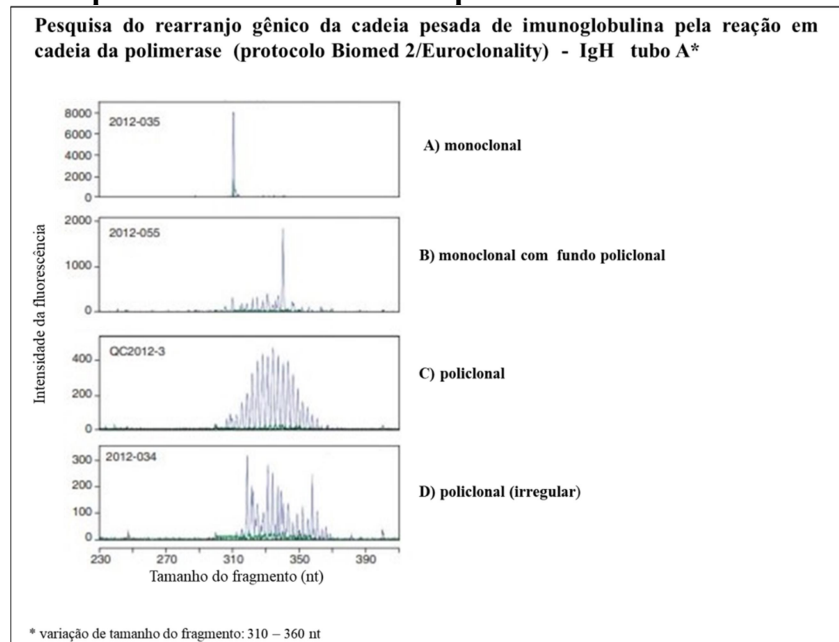
4.2.3.5 Avaliação da pesquisa de clonalidade pela análise do rearranjo gênico da Ig (PCR multiplex) e TCR γ

A interpretação da clonalidade para os ensaios de TCR γ foi determinada por exame visual dos eletroferogramas baseando-se em publicação da literatura (Shadrach e Warshawsky, 2004). A interpretação dos ensaios de clonalidade de células B foi realizada por exame visual dos eletroferogramas de acordo com as especificações descritas no manual do kit de BIOMED-2 (Anexo A) e publicações de padronização do protocolo (Langerak et al., 2012). Ambas interpretações foram realizadas por três observadores (JP, HFC e ABG).

4.2.3.5.1 Avaliação da pesquisa de clonalidade pela análise do rearranjo gênico da imunoglobulina

As amostras dos ensaios de clonalidade de células B foram classificadas do seguinte modo: monoclonal (se presença de pico (s) clonal bialélico ou monoalélico de rearranjo gênico foram detectados), policlonal (se apenas padrões de rearranjo gênico policlonal estavam presentes) ou monoclonal com fundo policlonal (em caso de pico (s) de rearranjo clonal, mas ainda dentro da presença do padrão de fundo policlonal); como exemplificado em Figura 11 (Roepman et al., 2016).

Figura 11 - Descrições técnicas e diferentes apresentações da análise da cadeia pesada de imunoglobulina pelo tubo A do PCR multiplex



FONTE: adaptado de Langerak et al., 2012

A, monoclonal. B, monoclonal com fundo policlonal. C, policlonal. D, policlonal irregular.

4.2.3.5.2 Avaliação da pesquisa de clonalidade pela análise do rearranjo gênico da cadeia pesada da imunoglobulina (IgH)

Na avaliação final da clonalidade do rearranjo gênico da cadeia pesada da Ig, foram considerados:

- resultado monoclonal: presença de pelo menos um tubo com resultado monoclonal/monoclonal em fundo policlonal entre os três tubos avaliados de IgH;
- resultado policlonal: ausência de quaisquer resultado monoclonal/monoclonal em fundo policlonal, inconclusivo ou com ausência de amplificação em pelo menos um dos três tubos avaliados de IgH;
- resultado inconclusivo: presença de pelo menos uma reação inconclusiva ou com ausência de amplificação, na ausência de quaisquer tubo com resultado monoclonal/monoclonal em fundo policlonal, entre os três tubos avaliados de IgH;
- resultado não avaliável: ausência de amplificação nos três tubos avaliados de IgH.

4.2.3.5.3 Avaliação da pesquisa de clonalidade pela análise do rearranjo gênico das cadeias leves da imunoglobulina (IgK e IgL)

Na avaliação dos resultados da pesquisa do rearranjo gênico das cadeias leves, foram considerados:

- a) resultado monoclonal: presença de pelo menos um tubo com resultado monoclonal/ monoclonal em fundo policlonal entre os três tubos avaliados de IgK e IgL;
- b) resultado policlonal: ausência de quaisquer resultado monoclonal/monoclonal em fundo policlonal, inconclusivo ou com ausência de amplificação em pelo menos um dos três tubos avaliados de IgK e IgL;
- c) resultado inconclusivo: presença de pelo menos uma reação inconclusiva ou com ausência de amplificação, na ausência de quaisquer tubo com resultado monoclonal/ monoclonal em fundo policlonal, entre os três tubos avaliados de IgK e IgL;
- d) resultado não avaliável: ausência de amplificação nos três tubos avaliados de IgK e IgL.

4.2.3.5.4 Avaliação final da pesquisa de clonalidade pela análise do rearranjo gênico da imunoglobulina

Na avaliação final da pesquisa de clonalidade pelo rearranjo gênico das cadeias pesada e leves da Ig através do PID proposto para este estudo, foram considerados:

- a) resultado monoclonal: presença de resultado monoclonal/monoclonal em fundo policlonal em pelo menos um dos seis tubos avaliados na pesquisa das cadeias pesada e leves da Ig;
- b) resultado indeterminado: presença de algum resultado inconclusivo ou resultado não avaliável, na ausência de quaisquer resultado monoclonal/monoclonal em fundo policlonal, entre os tubos avaliados pela pesquisa das cadeias pesada e leves da Ig;
- c) resultado policlonal: resultados policlonais em todos os seis tubos avaliados na pesquisa das cadeias pesada e leves da Ig;
- d) resultado não avaliável: ausência de amplificação em todos os tubos avaliados na pesquisa das cadeias pesada e leves da Ig.

Os resultados finais da pesquisa de clonalidade pelo rearranjo gênico das cadeias pesada e leve da Ig através do PID foram correlacionados com escala de pontuações. Foram considerados os seguintes resultados: policlonal (pontuação zero), indeterminado (um ponto) e monoclonal (dois pontos), como disposto em Tabela 12.

Tabela 12 - Avaliação do critério de pesquisa de clonalidade pela análise do rearranjo gênico da imunoglobulina pelo protocolo de investigação diagnóstica proposto para o estudo de processos linfoproliferativos cutâneos de células B

Avaliação	Resultados	Pontuações
Pesquisa de clonalidade pela análise do rearranjo gênico da imunoglobulina	Policlonal	0
	Indeterminado	1
	Monoclonal	2

4.2.4 Proposição do protocolo de investigação diagnóstica de processos linfoproliferativos cutâneos de células B

Os resultados da avaliação clínica-evolutiva, revisão histopatológica associada a estudo imuno-histoquímico e pesquisa de clonalidade pela análise do rearranjo gênico da Ig (PCR multiplex pelo protocolo BIOMED-2/ EuroClonality) dos 35 pacientes estudados foram estabelecidos como critérios no PID proposto para este estudo. Estes critérios foram associados a uma escala de pontuações proposta para fins de auxílio diagnóstico entre os processos linfoproliferativos B conforme detalhado a seguir (Tabela 13).

Tabela 13 - Protocolo de investigação diagnóstica proposto para o estudo de processos linfoproliferativos cutâneos de células B

Critérios	Avaliações	Resultados	Pontuações
A	Critério clínico-evolutivo	Não compatível com linfoma cutâneo	-1 ou 0
		Indeterminado	1 a 2
		Suspeito de linfoma cutâneo	3 a 5
		Compatível com linfoma cutâneo	≥ 6
B	Critério histopatológico e imuno-histoquímico	Não compatível com linfoma cutâneo/benigno	0
		Indeterminado	1
		Compatível com linfoma cutâneo/maligno	2
C	Pesquisa de clonalidade pela análise do rearranjo gênico da Ig (PCR multiplex)	Policlonal	0
		Indeterminado	1
		Monoclonal	2

4.2.5 Aspectos éticos e legais

Na coleta de dados em prontuário e revisão de material (proveniente de biópsias cutâneas prévias) não houve exposição aos pacientes pois os procedimentos já haviam sido realizados. Quanto à realização de novas biópsias, um procedimento minimamente invasivo, os pacientes preencheram e assinaram um TCLE (Apêndice D) antes de se submeterem ao estudo, após serem esclarecidos a respeito dos objetivos e procedimentos do trabalho.

Esse estudo foi desenvolvido de acordo com os princípios emanados da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde. O protocolo foi enviado para a análise do Comitê de Ética em Pesquisa (CAPPesq) do HCFMUSP e foi aprovado. O parecer consubstanciado do CEP número 1576295 encontra-se em Apêndice E.

4.2.6 Análise estatística

As análises estatísticas foram feitas utilizando o software STATA 13.0 (STATA Corp., Texas, Estados Unidos). As medidas de associação das variáveis qualitativas (entre os diferentes critérios do PID) foram analisadas pelo teste do qui-quadrado e teste exato de Fisher. Foi considerado valor estatisticamente significativo se o valor de p foi menor ou igual a 0,05. Foram calculadas a sensibilidade e a especificidade da pontuação final dos escores do PID. Fez-se o cálculo do valor de corte ideal para a diferenciação entre processo linfoproliferativo maligno e benigno através do índice de Youden.

5 RESULTADOS

5.1 Resultados dos dados gerais e demográficos

Os casos estudados incluíram 54,3% (19/35) homens e 45,7% (16/35) mulheres. Entre os pacientes, 82,8% (29/35) eram de raça/cor branca e 51,6% (16/31) estavam vivos com evidência de doença na última avaliação (Tabela 14). Os resultados dos dados gerais e demográficos estão detalhados em Apêndice F.

Tabela 14 - Resultados das frequências e porcentagens das variáveis sexo, raça/cor e estado de saúde na última avaliação dos 35 pacientes estudados de processos linfoproliferativos cutâneos de células B

Resultados	n (%)
Sexo	
feminino	16 (45,7)
masculino	19 (54,3)
Raça/cor	
branca	29 (82,8)
Parda	4 (11,4)
Negra	1 (2,9)
Ignorada	1 (2,9)
Estado de saúde na última avaliação *	
VCED	16 (51,6)
VSED	14(45,1)
MCED	1(3,3)

* Avaliação realizada em 31 dos 35 pacientes estudados. VCED: vivo com evidência de doença, VSED: vivo sem evidência de doença, MCED: morto com evidência de doença.

As idades na admissão no serviço variaram de 24 a 79 anos, com mediana de 58 anos. A mediana do tempo de evolução entre o início lesões e admissão foi de 12 meses e a mediana do tempo de seguimento entre a primeira e última consulta no serviço foi de 58 meses (Tabela 15).

Tabela 15 - Resultados analíticos de valor mínimo, quartil 25%, mediana, quartil 75% e valor máximo das variáveis de idade na admissão, tempo de evolução até a primeira consulta e tempo de seguimento dos 35 pacientes estudados de processos linfoproliferativos cutâneos de células B

Avaliação	Resultados	
Idade na admissão (anos)	Valor mínimo	24,0
	Quartil 25	38,0
	Mediana	58,0
	Quartil 75	66,0
	Valor máximo	79,0
Tempo de evolução entre o início das lesões e admissão (meses)	Valor mínimo	2,0
	Quartil 25	6,0
	Mediana	12,0
	Quartil 75	36,0
	Valor máximo	120,0
Tempo de seguimento entre a primeira e última consulta (meses)	Valor mínimo	1,0
	Quartil 25	34,0
	Mediana	58,0
	Quartil 75	116,0
	Valor máximo	166,0

Os resultados de mediana, quartis 25% e 75% e intervalos interquartílicos das variáveis de idade na admissão, tempo de evolução até a primeira avaliação e tempo de seguimento foram representados em gráfico tipo box-plot, conforme respectivamente apresentados nas figuras 12,13 e 14. No gráfico tipo box-plot de avaliação da variável tempo de evolução (entre o início das lesões e a primeira consulta) em Figura 13, observa-se a presença de *outlier* (120 meses) em relação aos demais dados.

Figura 12 - Gráfico tipo box-plot de avaliação da variável idade na admissão (anos)

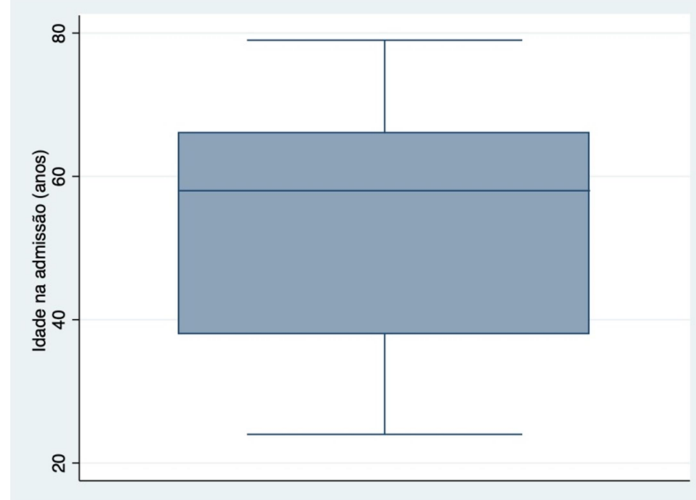


Figura 13 - Gráfico tipo box-plot de avaliação da variável tempo de evolução até a primeira avaliação (meses)

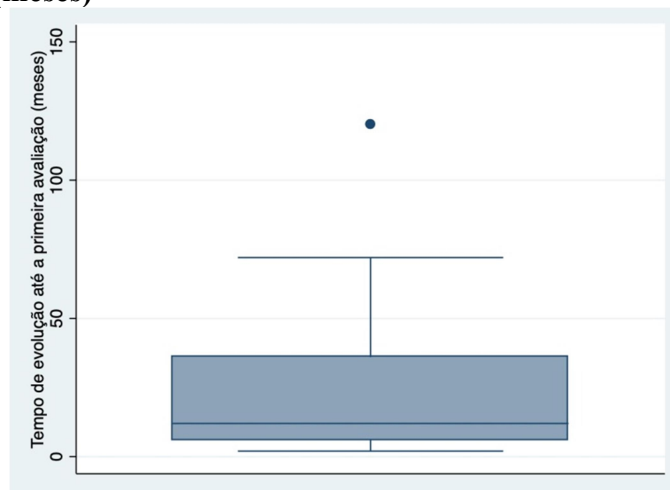
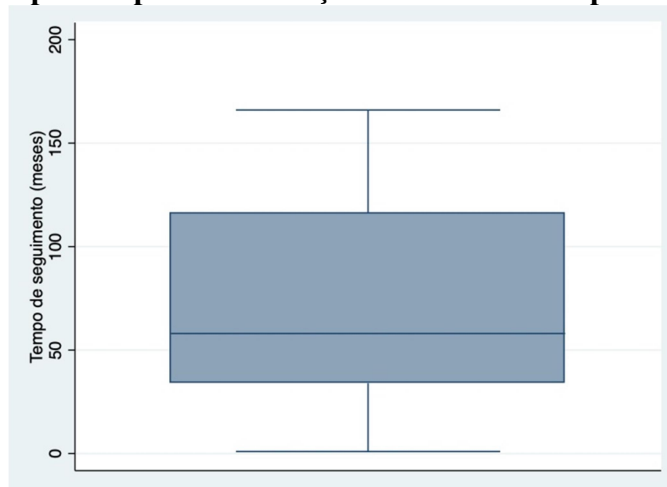


Figura 14 - Gráfico tipo box-plot de avaliação da variável tempo de seguimento (meses)



As topografias mais frequentes das lesões foram cabeça e pescoço (60%) e tronco (57,1%), conforme Tabela 16.

Tabela 16 - Topografia das lesões dos pacientes de processos linfoproliferativos cutâneos de células B do proposto estudo

Topografia de lesões	Total (N=35) n (%)
Cabeça e pescoço	21 (60,0)
Tronco	20 (57,1)
Membros inferiores	5 (14,3)
Membros superiores	3 (8,6)

Em relação aos pacientes com lesões em região de cabeça e pescoço, 95,2% (20/21) dos pacientes apresentaram lesões na face, 19% (4/21) no couro cabeludo e 4,8% (1/21) no pescoço (Tabela 17).

Tabela 17 - Topografia das lesões localizadas em região de cabeça e pescoço dos pacientes de processos linfoproliferativos cutâneos de células B do proposto estudo

Topografia de lesões	Total (N=21) n (%)
Face	20 (95,2)
Couro cabeludo	4 (19,0)
Pescoço	1 (4,8)

Em relação aos pacientes com lesões nos membros inferiores, 60% (3/5) dos pacientes apresentaram lesões nas coxas e 40% (2/5) nas pernas (Tabela 18).

Tabela 18 - Topografia das lesões localizadas em membros inferiores dos pacientes de processos linfoproliferativos cutâneos de células B do proposto estudo

Topografia de lesões	Total (N=5) n (%)
Coxas	3 (60,0)
Pernas	2 (40,0)

As lesões mais prevalentes foram placas (54,3%), seguidas de nódulos (45,7%), pápulas (31,4%) e tumores ulcerados (8,6%) como apresentado na Tabela 19.

Tabela 19 - Morfologia das lesões dos 35 pacientes de processos linfoproliferativos cutâneos de células B do proposto estudo

Morfologia de lesões	Total (N=35) n (%)
Placas	19 (54,3)
Nódulos	16 (45,7)
Pápulas	11 (31,4)
Tumores ulcerados	3 (8,6)

Os casos 14, 20 e 34 (conforme Apêndice F) apresentaram nódulos alopecicos infiltrados na região de cabeça e pescoço. Os casos 11, 12 e 16 (conforme Apêndice F) apresentaram tumores ulcerados nos membros inferiores (imagens dos quadros cutâneos estão disponíveis em Apêndice G).

Em 74,3% (26/35) dos casos ocorreram lesões múltiplas (Tabela 20).

Tabela 20 - Quantidade de lesões dos 35 pacientes de processos linfoproliferativos cutâneos de células B do proposto estudo

Quantidade de lesões	n (%)
Lesão única	9 (25,7)
Lesões múltiplas	26 (74,3)
Total	35 (100,0)

5.2 Resultados dos dados clínico-evolutivos

A avaliação dos critérios clínicos evidenciaram aspecto clínico sugestivo de linfoma cutâneo em 77,1% (27/35) dos pacientes avaliados (Tabela 21).

Tabela 21 - Resultados descritivos dos critérios clínicos dos 35 pacientes estudados de processos linfoproliferativos cutâneos de células B segundo protocolo de investigação diagnóstica proposto

Resultados dos critérios clínicos	n (%)
Aspecto clínico não sugestivo de linfoma cutâneo	2 (5,8)
Aspecto clínico duvidoso de linfoma cutâneo	6 (17,1)
Aspecto clínico sugestivo de linfoma cutâneo	27 (77,1)
Total	35 (100,0)

Os critérios evolutivos foram avaliados em 34 pacientes estudados, pois um paciente (caso 12) apresentou dados insuficientes para a completa avaliação da evolução. Os resultados descritivos dos critérios evolutivos estão dispostos na Tabela 22.

Tabela 22 - Resultados descritivos dos critérios evolutivos dos 34 pacientes estudados de processos linfoproliferativos cutâneos de células B segundo protocolo de investigação diagnóstica proposto

Resultados dos critérios evolutivos	Total (N=34) n (%)
Evolução com regressão espontânea após biópsia	6 (17,6)
Evolução com persistência do quadro pós tratamento	17 (50,0)
Evolução com recidiva	2 (5,9)
Surgimento de novas lesões a despeito do tratamento	11 (32,3)
Evolução com disseminação extracutânea	6 (17,6)

Os resultados finais dos critérios clínico-evolutivos do PID referentes aos 34 pacientes avaliados estão descritos na Tabela 23. As escalas de pontuações finais dos critérios clínico-evolutivos estão detalhadas em Apêndice H.

Tabela 23 - Resultados descritivos dos critérios clínico-evolutivos dos 34 pacientes estudados de processos linfoproliferativos cutâneos de células B segundo protocolo de investigação diagnóstica proposto

Resultados dos critérios clínico-evolutivos	n (%)
Não compatível com linfoma cutâneo	5 (14,7)
Indeterminado	4 (11,8)
Suspeito de linfoma cutâneo	14 (41,2)
Compatível com linfoma cutâneo	11 (32,3)
Total	34 (100,0)

5.3 Resultados da revisão histopatológica e estudo imuno-histoquímico

Os resultados descritivos detalhados da revisão histopatológica baseados nos critérios histopatológicos propostos para o estudo (Apêndice B) estão dispostos no Apêndice I. Os resultados da revisão imuno-histoquímica das lâminas baseados nos critérios imuno-histoquímicos propostos (Apêndice C) estão dispostos no Apêndice J.

Os resultados da associação dos critérios HP+IHQ dos pacientes avaliados estão detalhados na Tabela 24.

Tabela 24 - Resultados descritivos dos critérios HP+IHQ dos 35 pacientes estudados de processos linfoproliferativos cutâneos de células B segundo protocolo de investigação diagnóstica proposto

Resultados dos critérios HP+IHQ	n (%)
Não compatível com linfoma cutâneo	5 (14,2)
Indeterminado	8 (22,9)
Compatível com linfoma cutâneo	22 (62,9)
Total	35 (100,0)

HP: Histopatológico, IHQ: imuno-histoquímico.

Nos 22 pacientes com resultados compatíveis com linfoma cutâneo pela associação dos critérios HP+IHQ, foi possível avaliação dos subtipos histológicos em 20 pacientes. O subtipos histológicos centrofolicular, zona marginal e difuso de grande célula B tipo perna foram identificados conforme disponibilizado na Tabela 25. Dois pacientes (casos 1 e 2) foram considerados sem outra especificação (SOE) em relação ao subtipo histológico.

Tabela 25 - Resultados descritivos dos subtipos histológicos pelo critério de HP+IHQ dos pacientes estudados de processos linfoproliferativos cutâneos de células B segundo protocolo de investigação diagnóstica proposto

Subtipo histológico pelo critério HP+IHQ	n (%)
CF	13 (59,1)
ZM	4 (18,2)
DGCB tipo perna	3 (13,6)
SOE	2 (9,1)
Total	22 (100,0)

HP: histopatológico, IHQ: imuno-histoquímico. ZM: linfoma cutâneo primário de células B tipo zona marginal, CF: linfoma cutâneo primário de células B tipo centrofolicular, DGCB: linfoma cutâneo primário difuso de grande célula B, SOE: sem outra especificação.

5.4 Resultados da pesquisa de clonalidade (estudo do rearranjo gênico da imunoglobulina e rearranjo gênico do TCR)

5.4.1 Resultados da pesquisa de clonalidade pelo estudo do rearranjo gênico da imunoglobulina

5.4.1.1 Resultados de pesquisa de clonalidade do rearranjo gênico da cadeia pesada da imunoglobulina (IgH)

Na avaliação de clonalidade do rearranjo gênico da cadeia pesada da Ig, observou-se resultado monoclonal em 57,1% (20/35), resultados policlonais em 11,4% (4/35) e resultados inconclusivos em 17,1% (6/35) dos 35 pacientes avaliados. Em 14,4% (5/35) dos casos avaliados não houve amplificação em nenhum dos três tubos (A, B e C) de IgH.

Os resultados dos tubos A (alvo FR1-VHJH), tubos B (alvo FR2-VHJH) e tubos C (FR3-VHJH) de IgH estão na Tabela 26. Os resultados descritivos da pesquisa de clonalidade do rearranjo gênico de IgH estão detalhados no Apêndice K.

Tabela 26 - Resultados da pesquisa de clonalidade pela análise do rearranjo gênico da cadeia pesada da imunoglobulina dos pacientes estudados de processos linfoproliferativos cutâneos de células B segundo protocolo de investigação diagnóstica proposto

Resultados finais da pesquisa de cadeia pesada	Tubo A	Tubo B	Tubo C	Tubos A+B	Tubos A+C	Tubos B+C	Tubos A+B+C	Total
Resultado monoclonal	4 (11,5%)	3 (8,5%)	2 (5,8%)	2 (5,8%)	3 (8,5%)	3 (8,5%)	3 (8,5%)	20 (57,1%)
Resultado policlonal	-	-	-	-	-	-	4 (11,4%)	4 (11,4%)
Ausência de amplificação	-	-	-	-	-	-	5 (14,4%)	5 (14,4%)
Resultado inconclusivo	2 (5,7%)	-	-	4 (11,4%)	-	-	-	6 (17,1%)
Total	6 (17,2%)	3 (8,5%)	2 (5,8%)	6 (17,2%)	3 (8,5%)	3 (8,5%)	12 (34,3%)	35 (100,0%)

Tubo A: alvo FR1-VHJH, Tubo B: alvo FR2-VHJH, tubo C: alvo FR3-VHJH.

5.4.1.2 Resultados de pesquisa de clonalidade do rearranjo gênico das cadeias leves de imunoglobulina (IgK e IgL)

Na avaliação dos resultados de estudo de clonalidade do rearranjo gênico das cadeias leves, observou-se resultados monoclonais em 51,4% (18/35), resultados policlonais em 20,0% (7/35), resultados inconclusivos em 25,7% (9/35) e resultados não avaliáveis (ausência de amplificação em todos os tubos de avaliação de cadeias leves) em 2,9% (1/35) dos 35 pacientes avaliados.

A detecção de monoclonalidade de cadeia kappa exclusivamente através do tubo A (VK-JK) ocorreu em 27,7% (5/18) dos casos; e através do tubo B (Vk Kde /intron-Kde) ocorreu em 33,3% (6/18) dos casos com rearranjo monoclonal de kappa. A detecção de rearranjo de kappa tanto pelos tubos A quanto pelos tubos B ocorreu em 27,7% (5/18) dos casos avaliados. Entre os 18 pacientes com monoclonalidade do rearranjo gênico de cadeia leve, 11,1% (2/18) apresentaram rearranjo de cadeia leve lambda, e não houve nenhum caso com rearranjo exclusivo de lambda.

Os resultados da pesquisa de clonalidade do rearranjo gênico das cadeias leves kappa e lambda da Ig encontram-se na Tabela 27 e os resultados descritivos estão detalhados em Apêndice L.

Tabela 27 - Resultados da pesquisa de clonalidade pela análise do rearranjo gênico das cadeias leves da imunoglobulina dos pacientes estudados de processos linfoproliferativos cutâneos de células B segundo protocolo de investigação diagnóstica proposto

Resultados finais da pesquisa de cadeias leves	Kappa tubo A	Kappa tubo B	Lambda	Kappa tubos A+B	Kappa tubo A + lambda	Kappa tubo B + lambda	Kappa tubos A + B + lambda	Total
Resultado monoclonal	5 (14,3%)	6 (17,1%)	-	5 (14,3%)	-	1 (2,8%)	1 (2,8%)	18 (51,4%)
Resultado policlonal	-	-	-	-	-	-	7 (20,0%)	7 (20,0%)
Ausência de amplificação	-	-	-	-	-	-	1 (2,9%)	1 (2,9%)
Resultado inconclusivo	-	5 (14,3%)	-	1 (2,8%)	-	3 (8,6%)	-	9 (25,7%)
Total	5 (14,3%)	11 (31,4%)	0	6 (17,1%)	0	4 (11,4%)	9 (25,7%)	35 (100,0%)

Tubo A cadeia kappa: alvo VK-JK, Tubo B cadeia kappa: alvo VK-Kde + intron-Kde, tubo de cadeia lambda: alvo Vλ-Jλ

5.4.1.3 Resultados finais da clonalidade pela análise do rearranjo gênico das cadeias pesada e leves da imunoglobulina pelo PCR multiplex (BIOMED-2/Euroclonality)

Nos resultados finais da pesquisa de clonalidade através do PID proposto para este estudo, detectou-se 77,1% (27/35) dos casos com resultado monoclonal. Um paciente (caso 32) teve ausência de amplificação em todos os tubos da pesquisa de rearranjo gênico de Ig. Foram observados 8,6% (3/35) dos casos com resultado policlonal e 11,4% (4/35) com resultado indeterminado, conforme detalhado na Tabela 28.

Entre os 27 casos avaliados com resultado monoclonal pela pesquisa de rearranjo gênico da Ig, em 33,3% (9/27) dos casos a clonalidade foi detectada pela cadeia pesada. Em 25,9% (7/27) a clonalidade foi detectada pela cadeia leve. Em 40,7% (11/27), a clonalidade foi detectada em ambas cadeias pesada e leves de Ig.

O caso 30 apresentou rearranjo clonal de ambas cadeias leves (kappa e lambda), mas com padrão policlonal nos três tubos de cadeia pesada (FR1-VHJH, FR2-VHJH e FR3-VHJH). Isso implica na provável ocorrência de inativação dos alelos de IgK (podem ocorrer deleções monoalélicas ou bialélicas) e adicional rearranjo de IgL com associação de HSM. Em muitos casos de linfomas cutâneos de células B, a ausência de produtos clonais de IgH se devem a ocorrência de HSM que ocasiona a dificuldade de ligação ou anelamento dos *primers* (Langerak et al., 2012).

Os resultados descritivos da pesquisa de rearranjo gênico de Ig por PCR dos 35 casos avaliados de PLPCB estão detalhados em Apêndice M. Os eletroferogramas correspondentes à pesquisa de clonalidade pelo rearranjo de Ig de cadeias pesada e leves estão disponibilizados no Apêndice T.

Tabela 28 - Conclusão final da pesquisa de clonalidade pela análise do rearranjo gênico das cadeias pesada e leves da imunoglobulina pelo PCR multiplex do protocolo de investigação diagnóstica proposto para o estudo de processos linfoproliferativos cutâneos B

Resultados finais da pesquisa de rearranjo gênico	Apenas cadeia pesada	Apenas cadeias leves	Cadeias pesada e leves	Total
Resultado monoclonal	9 (25,7%)	7 (20,0%)	11 (31,4%)	27 (77,1%)
Resultado policlonal	-	-	3 (8,6%)	3 (8,6%)
Ausência de amplificação	-	-	1 (2,9%)	1 (2,9%)
Resultado indeterminado	-	-	4 (11,4%)	4 (11,4%)
Total	9 (25,7%)	7 (20,0%)	19 (54,3%)	35 (100,0%)

Em 22,8% (8/35) dos casos estudados, a conclusão do resultado da pesquisa de rearranjo gênico da Ig foi obtida através da realização de PCR em AC, pois o resultado de AFFIP foi não avaliável. Em 8,6% (3/35) dos casos foi realizada a pesquisa de rearranjo gênico da Ig através de PCR em AC e AFFIP. Os demais 68,6% (24/35) dos pacientes estudados tiveram o resultado de pesquisa de rearranjo gênico da Ig através de PCR realizada em material de AFFIP (Tabela 29).

Tabela 29 - Tipos de amostras cutâneas avaliadas na pesquisa de clonalidade pela análise do rearranjo gênico da imunoglobulina do protocolo de investigação diagnóstica proposto para o estudo de processos linfoproliferativos cutâneos de células B

Amostras cutâneas avaliadas na pesquisa de clonalidade pela análise do rearranjo gênico das cadeias pesada e leves da imunoglobulina	n (%)
Apenas amostras cutâneas fixadas em formol e incluídas em parafina	24(68,6)
Apenas amostras cutâneas congeladas	8 (22,8)
Em amostras cutâneas fixadas em formol e incluídas em parafina e em amostras congeladas	3(8,6)
Total	35 (100,0)

5.4.2 Resultados da pesquisa de clonalidade pelo estudo do rearranjo gênico do TCR γ

Na análise do rearranjo gênico do TCR γ , observou-se resultados policlonais em 67,8% (21/31) e resultados monoclonais em 6,4% (2/31) dos 31 casos avaliados (Tabela 30). Os resultados descritivos da pesquisa da clonalidade do rearranjo gênico do TCR γ dos 35 casos estudados de processos linfoproliferativos cutâneos B estão detalhados no Apêndice N.

Tabela 30 - Resultados da pesquisa de clonalidade pelo estudo do rearranjo gênico do TCR γ do protocolo de investigação diagnóstica proposto para o estudo de processos linfoproliferativos cutâneos de células B

Resultados da pesquisa de clonalidade pelo estudo do rearranjo gênico do TCRγ	n (%)
Policlonal	21 (67,8)
Não avaliável	8 (25,8)
Monoclonal	2(6,4)
Total	31 (100,0)

Em 16,1% (5/31) dos casos estudados, a conclusão do resultado de análise do rearranjo gênico do TCR γ foi obtida através da realização de PCR em AC, pois o resultado de

AFFIP foi não avaliável. Em relação a estes cinco casos, dois casos tiveram resultado monoclonal (casos 2 e 6). Em 16,1% (5/31) dos casos a análise do rearranjo gênico do TCR γ foi realizada tanto em AC quanto AFFIP, com resultados policlonais. Os demais 67,8% (21/31) dos pacientes avaliados tiveram o resultado de pesquisa de TCR γ realizada em AFFIP (Tabela 31).

Tabela 31 - Tipos de amostras cutâneas avaliadas na pesquisa de clonalidade pelo estudo do rearranjo gênico do TCR γ do protocolo de investigação diagnóstica proposto para o estudo de processos linfoproliferativos cutâneos de células B

Amostras cutâneas avaliadas na pesquisa de clonalidade pelo estudo do rearranjo gênico do TCRγ	n (%)
Apenas amostras cutâneas fixadas em formol e incluídas em parafina	21(67,8)
Apenas amostras cutâneas congeladas	5 (16,1)
Em amostras cutâneas fixadas em formol e incluídas em parafina e em amostras congeladas	5 (16,1)
Total	31 (100,0)

Os eletroferogramas correspondentes à pesquisa de clonalidade pelo rearranjo de TCR γ estão disponibilizados no Apêndice U.

5.5 Resultados dos critérios do protocolo de investigação diagnóstica

5.5.1 Resultados das frequências e porcentagens das pontuações referentes aos critérios avaliados no protocolo de investigação diagnóstica

Os resultados das frequências e porcentagens das pontuações obtidas pelos critérios CE, HP+IHQ, resultados de clonalidade B pela pesquisa do rearranjo gênico da Ig e somatório das pontuações finais avaliadas no PID estão disponíveis em Apêndice O.

5.5.2 Resultados da clonalidade B pela pesquisa do rearranjo gênico da imunoglobulina em relação aos subtipos histológicos pelos critérios histopatológicos associado a imuno-histoquímicos pelo protocolo proposto

Nos resultados da clonalidade B pela pesquisa do rearranjo gênico da imunoglobulina em relação aos casos com determinação dos subtipos histológicos pelos critérios histopatológicos associado a imuno-histoquímicos pelo protocolo proposto observou-se

resultados monoclonais em 86,4% (19/22), resultados indeterminados em 9,1% (2/22) e ausência de resultado monoclonal em 4,5% (1/22) dos casos avaliados. Os resultados detalhados estão disponíveis em Apêndice P.

5.5.3 Resultados finais dos critérios avaliados no protocolo de investigação diagnóstica proposto

Nos resultados finais dos critérios avaliados no PID referente aos casos estudados, observou-se casos compatíveis com linfomas cutâneos em 32,4% (11/34) pelos critérios CE, em 62,9% (22/35) pela avaliação HP+IHQ e em 77,1% (27/35) com resultados monoclonais na pesquisa de rearranjo gênico da Ig (Tabela 32).

Os resultados dos critérios do PID dos casos 26, 29, 30 e 35 estão detalhados em Apêndice S.

Tabela 32 - Resultados descritivos dos critérios avaliados no protocolo de investigação diagnóstica proposto dos pacientes estudados de processos linfoproliferativos cutâneos de células B

Resultados dos critérios avaliados no protocolo de investigação diagnóstica	n (%)
Compatível com linfoma cutâneo pelo critério clínico-evolutivo	11/34* (32,4)
Compatível com linfoma cutâneo pela avaliação HP+IHQ	22/35 (62,9)
Resultado monoclonal pela pesquisa de rearranjo gênico da Ig	27/35 (77,1)

* Avaliação final realizada em 34 dos 35 pacientes estudados. HP: histopatológico, IHQ: imuno-histoquímico.

As escalas das pontuações finais baseadas nos critérios avaliados pelo PID estão detalhadas no Apêndice Q.

5.5.4 Avaliação das associações entre os diferentes critérios do protocolo de investigação diagnóstica

As medidas de associação das variáveis qualitativas (entre os diferentes critérios do PID) foram analisadas pelo teste do qui-quadrado e teste exato de Fisher.

Na avaliação de associação dos resultados do critério CE em relação aos resultados do critério HP+IHQ dos 34 pacientes avaliados pelo PID (Quadro 1), obteve-se concordância de resultados compatíveis com linfoma cutâneo em 29,4% (10/34) dos pacientes avaliados ($p=0,021$).

Quadro 1 - Associação dos resultados do critério clínico-evolutivo em relação aos resultados do critério histopatológico associado ao imunohistoquímico dos 34 pacientes avaliados de processos linfoproliferativos cutâneos de células B pelo protocolo proposto

Critério HP+IHQ		Resultados do critério histopatológico associado ao imuno-histoquímico				
Critério CE	Resultados do critério clínico-evolutivo	Resultados (pontuações)	Não compatível com linfoma /benigno (0)	Indeterminado (1)	Compatível com linfoma /maligno (2)	Total
	Não compatível com linfoma cutâneo (-1 ou 0)		2 (5,9%)	0	3 (8,9%)	5 (14,8%)
	Indeterminado (1 a 2)		0	3 (8,9%)	1 (2,9%)	4 (11,7%)
	Suspeito de linfoma cutâneo (3 a 5)		2(5,9%)	5(14,7%)	7 (20,6%)	14(41,2%)
	Compatível com linfoma cutâneo (≥ 6)		1 (2,9%)	0	10 (29,4%)	11 (32,3%)
	Total		5 (14,7%)	8 (23,5%)	21 (61,8%)	34* (100%)

Cálculo de $p=0,021$. CE: clínico-evolutivo, HP: histopatológico, IHQ: imuno-histoquímico.* Avaliação final realizada em 34 pacientes estudados (caso 12 não teve resultado avaliável).

Na avaliação de associação dos resultados do critério CE em relação aos resultados de pesquisa do rearranjo gênico da imunoglobulina dos 33 pacientes avaliados com PLPCB pelo PID (Quadro 2), obteve-se concordância dos resultados compatíveis com linfoma cutâneo e resultado monoclonal em 30,3% (10/33) dos pacientes avaliados ($p=0,144$).

Quadro 2 - Associação dos resultados do critério clínico-evolutivo em relação aos resultados da pesquisa do rearranjo gênico da imunoglobulina dos 33 pacientes avaliados de processos linfoproliferativos cutâneos de células B pelo protocolo proposto

Critério de clonalidade B		Resultados da pesquisa do rearranjo gênico da imunoglobulina				
Critério CE		Resultados (pontuações)	Policlonal (0)	Indeterminado (1)	Monoclonal (2)	Total
Resultados do critério clínico-evolutivo	Não compatível com linfoma cutâneo (-1 ou 0)		0	2 (6,1%)	2 (6,1%)	4 (12,1%)
	Indeterminado (1 a 2)		1 (3,0%)	1 (3,0%)	2 (6,1%)	4 (12,1%)
	Suspeito de linfoma cutâneo (3 a 5)		1 (3,0%)	1 (3,0%)	12 (36,4%)	14 (42,5%)
	Compatível com linfoma cutâneo (≥ 6)		1 (3,0%)	0	10 (30,3%)	11 (33,3%)
	Total		3 (9,1%)	4 (12,1%)	26 (78,8%)	33* (100%)

Cálculo de $p=0,144$. CE: clínico-evolutivo. * Avaliação final realizada em 33 pacientes estudados (casos 12 e 32 não foram avaliáveis).

Na avaliação de associação dos resultados dos critérios HP+IHQ em relação aos resultados da pesquisa do rearranjo gênico da imunoglobulina dos 34 pacientes avaliados (Quadro 3), obteve-se concordância dos resultados compatíveis com linfoma em 55,9% (19/34) dos pacientes avaliados ($p=0,543$).

Quadro 3 - Associação dos resultados do critério histopatológico associado ao imunohistoquímico em relação aos resultados da clonalidade B dos 34 pacientes avaliados de processos linfoproliferativos cutâneos de células B pelo protocolo proposto

Critério de clonalidade B		Resultados de pesquisa do rearranjo gênico da imunoglobulina				
Critério HP+IHQ		Resultados (pontuações)	Policlonal (0)	Indeterminado (1)	Monoclonal (2)	Total
Resultados do critério histopatológico associado ao imuno-histoquímico	Não compatível com linfoma/benigno (0)		1 (2,9%)	1 (2,9%)	2 (5,88%)	4 (11,8%)
	Indeterminado (1)		1 (2,9%)	1 (2,9%)	6 (17,7%)	8 (23,5%)
	Compatível com linfoma/maligno (2)		1 (2,9%)	2 (5,9%)	19 (55,9%)	22 (64,7%)
	Total		3 (8,8%)	4 (11,8%)	27 (79,4%)	34* (100%)

Cálculo de $p=0,543$. HP: histopatológico, IHQ: imuno-histoquímico.* Avaliação final realizada em 34 pacientes estudados (caso 12 não teve resultado avaliável).

Foi considerado valor estatisticamente significativo se o valor de p foi menor ou igual a 0,05. Assim, detectou-se significância estatística na associação entre o grau de suspeição clínica-evolutiva e o resultado histopatológico-imunohistoquímico ($p=0,021$). As demais associações entre os critérios restantes não apresentaram significância estatística, conforme cálculo dos valores de p.

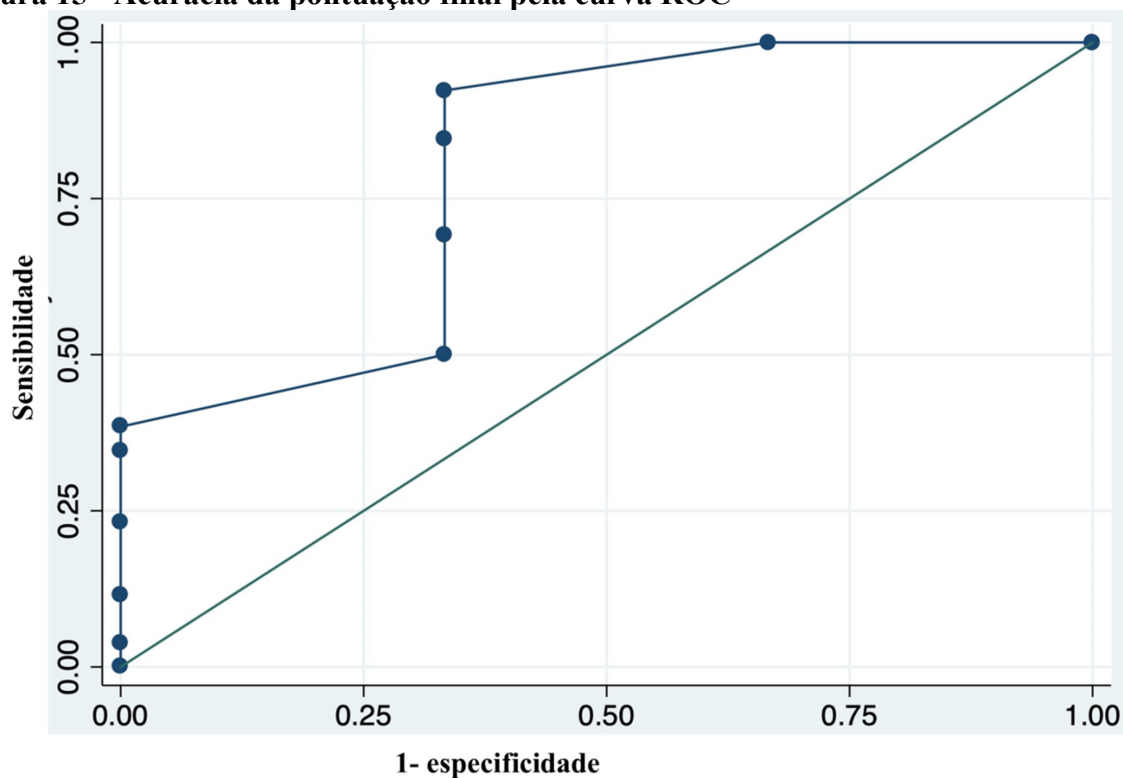
5.5.5 Avaliação de sensibilidade e especificidade da pontuação final dos escores

Ao se considerar a possibilidade da clonalidade B como método padrão-ouro para a diferenciação entre processo linfoproliferativo maligno e benigno, foram calculadas a sensibilidade e a especificidade da pontuação final dos escores do PID (resultados detalhados na Tabela 33). Através do índice de Youden, fez-se o cálculo do valor de corte ideal para a diferenciação entre processo linfoproliferativo maligno e benigno. O valor definido como ideal de corte na pontuação final foi de quatro (sensibilidade de 100% e especificidade de 33,33%). Também foi avaliada a acurácia da pontuação final a partir da curva ROC, com acurácia da pontuação final de 80,13% (Figura 15).

Tabela 33 - Resultados de sensibilidade e especificidade de acordo com a pontuação final do protocolo de investigação diagnóstica

Pontuação final	Sensibilidade	Especificidade	Classificado corretamente
≥2	100%	0,00%	89,7%
≥4	100%	33,33%	93,10%
≥5	92,3%	66,7%	89,7%
≥6	84,6%	66,7%	82,8%
≥7	69,2%	66,7%	68,9%
≥8	50,00%	66,7%	51,7%
≥9	38,5%	100%	44,8%
≥10	34,6%	100%	41,4%
≥12	23,1%	100%	31,0%
≥14	11,5%	100%	20,7%
≥15	3,9%	100%	13,8%
>15	0,00%	100%	10,3%

Figura 15 - Acurácia da pontuação final pela curva ROC



Área calculada abaixo da curva ROC: 0,8013

5.5.6 Contribuição da pesquisa do rearranjo gênico da Ig para conclusão do diagnóstico final pelo protocolo de investigação diagnóstica proposto

A partir dos resultados do PID, foi analisada a possibilidade de contribuição diagnóstica da pesquisa do rearranjo gênico da Ig em relação aos resultados da associação dos critérios CE e HP+IHQ, que demonstraram possuir significância estatística ($p=0,021$ em Quadro 1), para conclusão diagnóstica final dos casos avaliados. O resultado da pesquisa do rearranjo gênico da Ig foi avaliado em relação aos resultados dos critérios CE e HP+IHQ, e foram interpretados conforme proposição abaixo (Quadro 4):

- a) corroborou o diagnóstico de linfoma cutâneo se houve concordância do resultado monoclonal pela ‘pesquisa do rearranjo gênico da Ig’ (escore 2) com resultados sugestivos (escore 3 a 5) ou compatíveis com linfoma cutâneo (escore \geq a 6) pelo ‘critério CE’, e linfoma cutâneo/maligno (escore 2) pelo ‘critério HP+IHQ’;

- b) favoreceu o diagnóstico de linfoma cutâneo se houve concordância do resultado monoclonal (escore 2) pela ‘pesquisa do rearranjo gênico da Ig’ com o resultado sugestivo (escore 3 a 5) ou compatível (escore \geq a 6) pelo ‘critério CE’, ou com resultado de linfoma cutâneo/maligno (escore 2) pelo ‘critério HP+IHQ’;
- c) possibilitou o diagnóstico de linfoma cutâneo se resultado monoclonal pela ‘pesquisa do rearranjo gênico da Ig’ (escore 2) e indeterminação dos resultados pelo ‘critério CE’ (escore 1 ou 2) e pelo ‘critério HP+IHQ’ (escore 1) ;
- d) não determinou o diagnóstico final se resultado indeterminado pela “pesquisa do rearranjo gênico da Ig’ (escore 1) e indeterminação dos resultados do ‘critério CE’ (escore 1 ou 2) e ‘critério HP+IHQ’ (escore 1) ;
- e) favoreceu o diagnóstico de processo reativo benigno (pseudolinfoma cutâneo) se o resultado foi policlonal pela ‘pesquisa do rearranjo gênico da Ig’ (escore 0) em concordância com resultado não sugestivo de linfoma cutâneo (escore (-)1 ou zero) pelo ‘critério CE’ e não compatível com linfoma cutâneo (escore zero) pelo ‘critério HP+IHQ’;
- f) discordou do diagnóstico de linfoma cutâneo se o resultado da ‘pesquisa do rearranjo gênico da Ig’ foi discordante dos resultados do ‘critério CE’ e ‘critério HP+IHQ’.

Quadro 4 - Contribuição diagnóstica da pesquisa do rearranjo gênico da imunoglobulina em relação aos resultados da associação dos critérios clínico-evolutivos e histopatológicos associados a imunohistoquímicos

Interpretação final do Protocolo de investigação diagnóstica	Escore do critério ‘pesquisa do rearranjo gênico da imunoglobulina’		Escore do ‘critério clínico-evolutivo’		Escore do ‘critério histopatológico e imunohistoquímico’
Corroborou o diagnóstico de linfoma cutâneo	2	E	≥ 3	E	2
Favoreceu o diagnóstico de linfoma cutâneo	2	E	≥ 3	Ou	2
Possibilitou o diagnóstico de linfoma cutâneo	2	E	1 ou 2	E	1
Não determinou o diagnóstico final	1	E	1 ou 2	E	1
Favoreceu o diagnóstico de processo reativo benigno	0	E	zero ou 1	E	zero
Discordou do diagnóstico de linfoma cutâneo	discordância entre todos os escores dos critérios				

A avaliação da contribuição diagnóstica da pesquisa do rearranjo gênico da Ig em relação aos critérios associados (CE e HP+IHQ) dos 34 casos avaliados foi de: corroborou o diagnóstico de linfoma cutâneo em 44,1% (15/34), favoreceu o diagnóstico de linfoma cutâneo em 32,4% (11/34), possibilitou o diagnóstico de linfoma cutâneo em 2,9% (1/34), discordou do diagnóstico de linfoma cutâneo em 17,7% (6/34), não determinou o diagnóstico de linfoma cutâneo em 2,9% (1/34) dos casos (Tabela 34). Os resultados detalhados estão disponibilizados em Apêndice R.

Tabela 34 - Resultados descritivos da contribuição diagnóstica da pesquisa do rearranjo gênico da Ig em relação aos resultados da associação dos critérios CE e HP+IHQ do protocolo de investigação diagnóstica proposto para o estudo de PLPCB

Resultados da contribuição diagnóstica da pesquisa do rearranjo gênico da Ig em relação aos resultados dos critérios CE e HP+IHQ	Total* n (%)
Corroborou o diagnóstico de linfoma cutâneo	15/34 (44,1)
Favoreceu o diagnóstico de linfoma cutâneo	11/34(32,4)
Possibilitou o diagnóstico de linfoma cutâneo	1/34 (2,9)
Discordou do diagnóstico de linfoma cutâneo	6/34 (17,7)
Não determinou o diagnóstico de linfoma cutâneo	1/34 (2,9)
Favoreceu o diagnóstico de processo reativo benigno/pseudolinfoma cutâneo	0/34 (0,0)

PLPCB: processos linfoproliferativos cutâneos de células B, CE: clínico-evolutivo, HP+IHQ: histopatológico associado a imunohistoquímico, Ig: imunoglobulina, * Avaliação final realizada em 34 dos 35 pacientes estudados

6 DISCUSSÃO

PLPCB se apresentam como desafios diagnósticos principalmente no que se refere a significativa sobreposição de achados clínicos e histopatológicos entre dermatoses inflamatórias benignas e desordens linfoproliferativas cutâneas. A avaliação da importância de testes para pesquisa de clonalidade no contexto de desordens linfoproliferativas surgiu secundariamente ao reconhecimento das limitações inerentes à sensibilidade e especificidade diagnósticas da histomorfologia e imunohistoquímica para distinguir de forma confiável entre apresentações precoces de desordens linfoproliferativas e dermatoses inflamatórias benignas. É notória a percepção de que o diagnóstico de desordens linfoproliferativas é baseado principalmente na associação de características clínicas, histopatológicas e imunofenotípicas do infiltrado atípico, e os testes de clonalidade tem importância coadjuvante na conclusão diagnóstica final. Mas nos casos em que o diagnóstico é ambíguo ou incerto, os ensaios de clonalidade por meio de testes moleculares baseados em PCR representam o próximo passo mais adequado na avaliação (Comfere et al., 2018a).

A técnica de PCR baseada nos protocolos EuroClonality/ BIOMED-2 está disponível comercialmente e permite vantagens como: a padronização da técnica de PCR para detecção de clonalidade dos genes da Ig, assim como a realização do método em AFFIP que facilita a rotina de trabalho e investigação diagnóstica.

O presente estudo avaliou o auxílio diagnóstico da pesquisa de clonalidade B pelo PCR multiplex através do protocolo EuroClonality/ BIOMED-2 na análise retrospectiva do rearranjo gênico de IgH (tubo A - alvo FR1VHJH, tubo B - alvo FR2 VHJH e tubo C - alvo FR3 VHJH), IgK (tubo A - alvo VK-JK e tubo B - alvo Vk Kde /intron-Kde) e IgL (alvo V λ -J λ) em uma população de 35 casos com PLPCB (PLC, LCPCB e casos com indefinição diagnóstica) em material de arquivo (35 AFFIP e 11 AC) proveniente de biópsias de lesões cutâneas. Entre os 35 pacientes estudados com PLPCB, houve prevalência de homens (54,3%) e raça/cor branca (82,8%), com mediana da idade de 58 anos no início do acompanhamento no serviço. Nos Estados Unidos, os LCPCB afetam mais comumente homens do que mulheres, com aumento de incidência com a idade e mostra-se quase exclusivamente uma doença de brancos não hispânicos (Bradford et al., 2009). Assim, os

resultados dos dados demográficos da população estudada foram muito semelhantes aos dados epidemiológicos já publicados na literatura.

Na revisão histopatológica e imuno-histoquímica da presente casuística, 62,9 % (22/35) dos casos foram compatíveis com linfomas cutâneos (13 LCPCF, 4 LCPZM, 3 LCPDGCB-TP e 2 SOE). Em 14,2% (5/35) dos casos, concluiu-se por lesões não compatíveis com linfoma cutâneo (processo benigno). Entretanto, em 22,9% (8/35) dos casos não foi possível a diferenciação entre linfoma e pseudolinfoma cutâneo.

Dentre os casos compatíveis com linfomas cutâneos (critério HP+IHQ) na casuística do nosso estudo, 59,1% (13/22) tiveram detecção de monoclonalidade pelo estudo do rearranjo gênico de IgH (alvos FR1VHJH, FR2 VHJH e FR3 VHJH), com valores semelhantes aos demonstrados por Lukowsky et al. Estes autores avaliaram o protocolo BIOMED-2 para estudo do rearranjo gênico de IgH em 43 biópsias cutâneas de AFFIP de casos confirmados de LCPCB (27 LCPCF, 11 LCPZM/imunocitoma e 5 LCPDGCB-TP) comparativamente a outras abordagens de PCR. A análise do rearranjo gênico de IgH (alvos FR1VHJH, FR2 VHJH e FR3 VHJH) pelo BIOMED-2 evidenciou taxa de detecção geral de monoclonalidade de 56% (24/43) (Lukowsky et al., 2006). É importante ressaltar que o gene de IgH é o mais frequentemente estudado, sendo a principal razão, fisiológica: o gene IgH se reorganiza antes dos genes das cadeias leves e algumas neoplasias de células B, como linfomas/leucemias linfoblásticas de células B precursoras, não apresentam rearranjo dos genes das cadeias leves (van Dongen e Wolvers-Tettero, 1991; Bagg et al., 2002).

O estudo de Morales et al. foi o primeiro a avaliar o rearranjo gênico tanto de IgH quanto de IgK como alvos para ensaios de clonalidade através do protocolo padronizado BIOMED-2 em LCPCB. Amostras fixadas em formol de tecidos cutâneos de 26 pacientes com LCPCB e 23 pacientes com infiltrados linfóides benignos foram analisadas para o estudo de rearranjo gênico de IgH e IgK. Pacientes com diagnóstico de LCPDGCB-TP foram excluídos, sendo incluídos os subtipos indolentes LCPZM e LCPCF na avaliação. O estudo de rearranjo gênico de IgH detectou monoclonalidade em 69% (18/26) dos casos de LCPCB, sendo 73 % (11/15) no subtipo LCPZM e 64% (7/11) no subtipo LCPCF. Já na avaliação isolada de IgK, a monoclonalidade foi detectada em 65% (17/26) das amostras dos casos de LCPCB, com 60% (9/15) no subtipo LCPZM e 73% (8/11) no subtipo LCPCF. Na avaliação final dos resultados de rearranjo gênico de IgH em associação com IgK, monoclonalidade geral foi detectada em 85% (22/26) dos pacientes com LCPCP sendo 80% (12/15) no subtipo

LCPZM e 91% (10/11) no subtipo LCPCF, além de 4% (1/23) dos pacientes com infiltrados benignos. Assim, a associação de avaliação de IgK a IgH aumentou a sensibilidade da detecção clonal de 69% para 85% (Morales et al., 2008; Felcht et al., 2011).

Na nossa casuística, excluídos os casos de LCPDGCB-TP e aqueles SOE, observamos taxas de detecção de monoclonalidade na pesquisa de rearranjo gênico de IgH e IgK de 82,35% (14/17), portanto com resultados semelhantes aos de Morales et al. Na avaliação dos subtipos de LCPCB, detectamos monoclonalidade em 84,6 % (11/13) dos pacientes com LCPCF e em 75% (3/4) dos pacientes com LCPZM, também com resultados semelhantes aos publicados por Morales et al. (Morales et al., 2008).

No presente estudo, foi realizada a avaliação final da pesquisa do rearranjo gênico através da associação de IgH, IgK e IgL entre os casos compatíveis com linfomas cutâneos (critério HP+IHQ), com taxas de monoclonalidade em 86,3 % (19/22) dos casos. Assim, a associação dos resultados de cadeias pesada (IgH) e leves (kappa e lambda) aumentou a sensibilidade da detecção clonal de 59,1% (13/22) para 86,3 % (19/22) em comparação à avaliação isolada de IgH. Assim, a pesquisa de rearranjo gênico de ambas IgK e IgH pode aumentar a sensibilidade da detecção de clonalidade em casos de LCPCB fixados em formalina (Morales et al., 2008), como também demonstramos em nosso estudo.

Os resultados finais da nossa casuística demonstraram monoclonalidade em 40% (2/5) dos casos não compatíveis com linfoma cutâneo e em 75% (6/8) dos casos com indeterminação diagnóstica na diferenciação entre linfoma e pseudolinfoma cutâneo pelo critério HP+IHQ. Isto sugere o papel diagnóstico complementar dos ensaios de clonalidade através da PCR nos casos com dificuldade diagnóstica pela histomorfologia e imunohistoquímica.

López Aventín et al. avaliaram 35 pacientes diagnosticados com linfomas cutâneos de células B (LCPZM =21, LCPCF =12 e LCPDGCB-TP =2). A clonalidade de células B foi avaliada pela pesquisa do rearranjo gênico de IgH (alvos FR1-3VH-JH e DH-JH) e IgK. A avaliação completa de IgH (VH-JH) detectou monoclonalidade em 88,6% (31/35) dos casos de linfomas cutâneos de células B. O alvo FR1VHJH apresentou maior resultado clonal (67,7%), seguido por FR2 VHJH (55,9%) e FR3 VHJH (47,1%). Apenas 4 pacientes (3 LCPZM e 1 LCPDGCB-TP) exibiram resultados não clonais de IgH (VH-JH). No entanto, a adição dos testes IgK e IgH incompleto (DH-JH) também permitiu detecção clonal nestes 4

casos (López Aventín et al., 2021). Em nosso estudo, as frequências de clonalidade em relação aos diferentes alvos de IgH foram: 31,8% (7/22) de FR1VHJH, 31,8% (7/22) de FR2VHJH e 36,4% (8/22) do alvo FR3 VHJH. Na nossa casuística, os altos índices de não amplificação principalmente dos alvos FR1 e FR2 de IgH podem ter sido ocasionados pela degradação de DNA em algumas AFFIP já antigas. Não foi realizado o estudo do alvo IgH DH-JH em nossa casuística. Dentre os 35 pacientes avaliados no nosso estudo, detectou-se resultado monoclonal pela análise isolada do rearranjo de IgH em 57,1% (20/35) dos casos e pelo rearranjo gênico de cadeia leve em 51,4% (18/35) dos pacientes avaliados. Em todos estes 18 casos houve rearranjo monoclonal de kappa e apenas 5,7% (2/35) dos casos houve rearranjo monoclonal de cadeia lambda. Não houve nenhum caso com rearranjo exclusivo de cadeia leve lambda.

Em casos suspeitos de linfoproliferações de células B, a pesquisa de clonalidade com a combinação de alvos IgH V-J e IgK parece ser suficiente na grande maioria dos casos (> 95%), e a avaliação dos alvos IgH D-J e IgL pode ser ocasionalmente útil como abordagem de segunda linha (Langerak et al., 2012).

Melotti et al. avaliaram 29 casos de PLPCB classificados como LCPCB (13 casos), PLCB (6 casos) e inconclusivos (10 casos) pela histologia e imuno-histoquímica. A clonalidade foi investigada pela análise do gene de IgH através de protocolos BIOMED-2 para IgH FR2 (tubo B), IgH FR3 (tubo C) e um método tradicional para IgH FR3 (IgH-trad). A investigação do rearranjo gênico de IgK foi realizada pelos tubos A e B de IgK pelo BIOMED-2. Os resultados mostraram monoclonalidade em 61,5% (8/13) dos casos de LCPCB e policlonalidade em 66,6% (4/6) dos casos de PLCB. Além disso, a monoclonalidade foi demonstrada em dois dos casos inconclusivos por histologia e imuno-histoquímica, demonstrando a utilidade da PCR como uma ferramenta auxiliar de diagnóstico para LCPCB (Melotti et al., 2010).

É notório que o resultado dos estudos de clonalidade de Ig através de PCR multiplex apresentam melhor desempenho em material de células frescas ou congeladas (Langerak et al., 2012). No entanto, o uso de tecidos provenientes de AFFIP também provou ser uma opção factível. No estudo, confirmou-se a viabilidade de realização da PCR em tecidos fixados em formol e incluídos em parafina em 68,6% (24/35) dos pacientes avaliados, mesmo em amostras antigas.

A análise do rearranjo gênico do TCR γ detectou policlonalidade em 71% (22/31) dos casos avaliados, resultados não avaliáveis em 22,6% (7/31) e resultados monoclonais em 6,4% (2/31) dos casos. Deve-se considerar que alguns linfomas de células B podem demonstrar rearranjos monoclonais do gene TCR, além da possibilidade de “pseudoclonalidade” de células T quando apenas algumas células T estão presentes na amostra (Swerdlow et al., 2013).

Apesar da amostra reduzida deste estudo, esses resultados sugerem que o protocolo BIOMED-2 possa ser usado no auxílio da diferenciação entre infiltrados cutâneos de células B malignos e infiltrados benignos. Como um dos principais limitadores do estudo, tem-se a ausência de duplicata das reações para excluir pseudomonoclonalidade. Resultados falsos positivos são comuns especialmente em tecidos extranodais (por exemplo, pele) onde apenas pequenas quantidades de malignas células B podem estar presentes; isso é especialmente verdade se uma amostra é analisada apenas uma vez. Em tais circunstâncias, análises repetidas podem auxiliar na avaliação da possibilidade de pseudomonoclonalidade (Felcht et al., 2011). Outra limitação do nosso estudo, foi a ausência de realização da pesquisa de rearranjos gênicos das cadeias pesada e leve da imunoglobulina em casos benignos inquestionáveis.

A diferenciação diagnóstica dos PLPCB entre afecções benignas e malignas é desafiadora tanto do ponto de vista clínico como da análise patológica e fenotípica. Esta é uma área que precisa de mais investigação e desenvolvimento de algoritmos de apoio à decisão diagnóstica que facilitem a identificação da real contribuição dos testes de pesquisa de clonalidade no contexto de características clínicas, histopatológicas e imunofenotípicas de infiltrados linfoides atípicos (Comfere et al., 2018b), a exemplo do algoritmo existente para diagnóstico da MF incipiente nos LCPCT (Pimpinelli et al., 2005). No presente estudo foi proposto um protocolo de investigação diagnóstica baseado em critérios CE, HP+IHQ e pesquisa da clonalidade por estudo do rearranjo gênico da Ig (PCR) para fins de auxílio diagnóstico. Neste estudo, a associação dos achados clínicos e evolutivos na definição do critério CE permitiu uma avaliação mais detalhada e padronizada ao utilizar informações morfológicas, topográficas, clínicas e dados de seguimento na avaliação clínica-evolutiva dos casos estudados. Espera-se que este algoritmo proposto mostre utilidade no auxílio diagnóstico entre processos malignos e reativos de PLPCB. Em nosso conhecimento, a proposição de algoritmo neste contexto é uma ideia inovadora sem existência de publicações

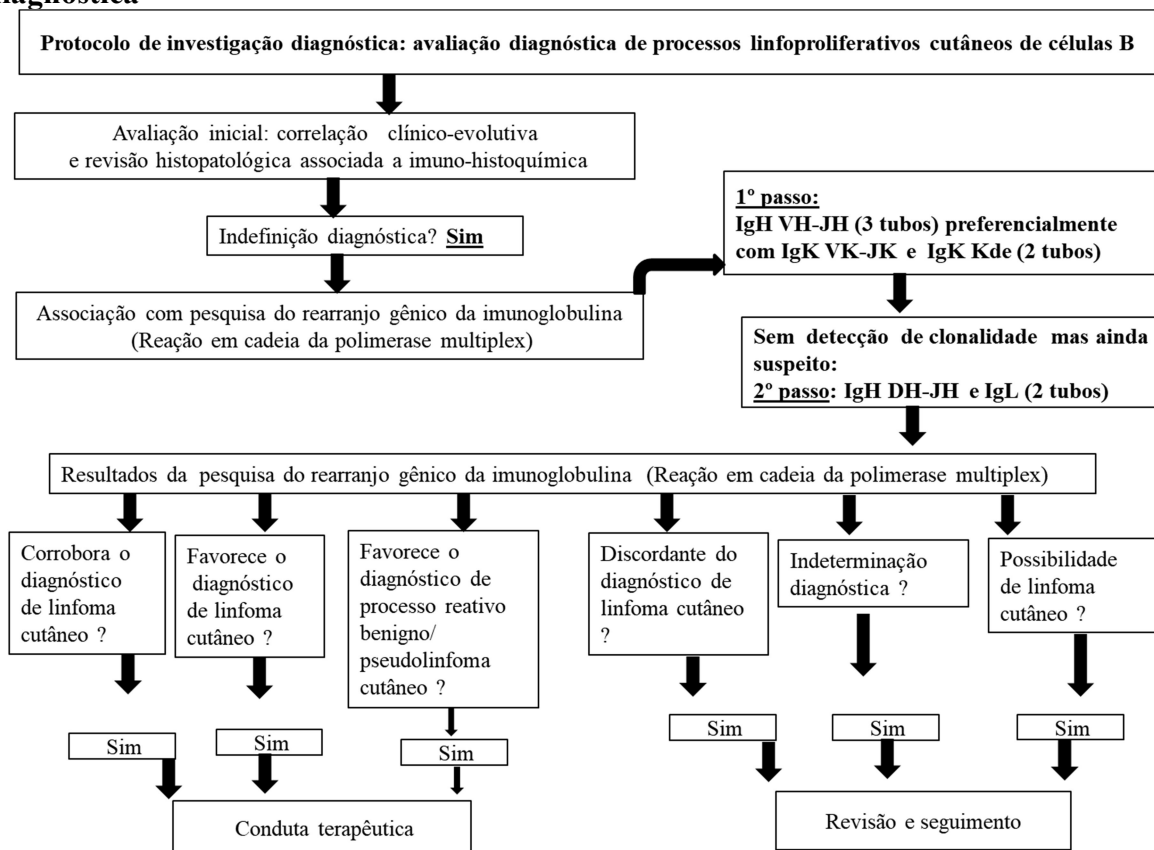
já existentes com esta finalidade e proposição. Reconhecemos que este algoritmo é uma proposta inicial que pode requerer refinamento dos critérios propostos assim como validação de sua aplicabilidade na prática clínica.

No protocolo proposto, considerando a avaliação CE, HP+IHQ e clonalidade B, foram calculadas a sensibilidade e a especificidade da pontuação final dos escores do PID (resultados detalhados na Tabela 33). A melhor sensibilidade para a diferenciação entre processo linfoproliferativo maligno e benigno foi definida como pontuação final \geq quatro (sensibilidade de 100% e especificidade de 33,33%). A melhor especificidade foi determinada a partir da pontuação \geq 9 (sensibilidade de 38,5% e especificidade de 100%). A acurácia da pontuação final foi de 80,13%.

A contribuição do PID na conclusão diagnóstica final em casos de PLPCB com dificuldade diagnóstica é acompanhada da proposição de um algoritmo de conclusão final do PID (Figura 16). Os casos, que após completa realização do PID, corroborarem, favorecerem o diagnóstico final de linfoma cutâneo ou o diagnóstico de processo reativo benigno (pseudolinfoma cutâneo) devem prosseguir com a conduta terapêutica apropriada, mas os casos com discordância, indeterminação ou possibilidade diagnóstica de linfoma cutâneo devem ser revisados e monitorizados até completa elucidação diagnóstica final.

A proposição de um organograma que incremente a acurácia diagnóstica, principalmente nos casos indeterminados, possibilita uma melhor abordagem e otimização terapêutica. Desta maneira, diagnósticos mais definidos permitirão ao médico assistente prosseguir com um plano de tratamento e seguimento mais apropriados.

Figura 16 - Algoritmo proposto para conclusão final do protocolo de investigação diagnóstica



Algoritmo proposto para conclusão diagnóstica final e conduta de casos de PLPCB com dificuldade diagnóstica.

7 CONCLUSÕES

No presente estudo, foi possível:

- a) confirmar a aplicabilidade e utilidade da pesquisa de clonalidade através do rearranjo gênico das cadeias pesada e leve de Ig em material proveniente de biópsias cutâneas no auxílio diagnóstico de PLPCB (PLC, LCPCB e casos com indefinição diagnóstica) de pacientes acompanhados no Ambulatório de Linfomas Cutâneos da Divisão de Clínica Dermatológica do HCFMUSP;
- b) confirmar a funcionalidade da reação em cadeia de polimerase pelo protocolo BIOMED-2/Euroclonality tanto em amostras fixadas em formol e incluídas em parafina quanto em amostras congeladas;
- c) propor e aplicar um protocolo de investigação diagnóstica para PLPCB que mostrou benefícios na associação dos critérios clínico-evolutivos, avaliação histopatológica e imunohistoquímica e pesquisa de clonalidade de células B;
- d) identificar a contribuição do protocolo proposto para a conclusão diagnóstica final de casos de PLPCB;
- e) permitir a realização de um algoritmo de conclusão diagnóstica final e conduta de casos de PLPCB com dificuldade diagnóstica.

REFERÊNCIAS

Abbas F, Yazbek SN, Shammaa D, Hoteit R, Fermanian P, Mahfouz R. Invivoscribe BIOMED-2 primer mixes in B-cell immunoglobulin gene rearrangement studies: Experience of a molecular diagnostics laboratory in a major tertiary care center. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2014;18(12):787–90.

Aisenberg AC. Utility of Gene Rearrangements in Lymphoid Malignancies. *Annu Rev Med* [Internet]. fevereiro de 1993;44(1):75–84. Available at: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.me.44.020193.000451>

Alves V avancini, Bacchi CE, Vassallo J. Manual de imuno-histoquímica. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia; 1999.

Arai E, Shimizu M, Hirose T. A review of 55 cases of cutaneous lymphoid hyperplasia: Reassessment of the histopathologic findings leading to reclassification of 4 lesions as cutaneous marginal zone lymphoma and 19 as pseudolymphomatous folliculitis. *Hum Pathol*. 2005;36(5):505–11.

Ayoubi N, Haque A, Vera N, Ma S, Messina J, Khushalani N, et al. Ipilimumab/nivolumab-induced pseudolymphoma in a patient with malignant melanoma. *J Cutan Pathol*. 2020;47(4):390–3.

Bagg A, Braziel RM, Arber DA, Bijwaard KE, Chu AY. Immunoglobulin Heavy Chain Gene Analysis in Lymphomas. *J Mol Diagnostics* [Internet]. maio de 2002;4(2):81–9. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S152515781060685X>

Bergman R. Pseudolymphoma and cutaneous lymphoma: Facts and controversies. *Clin Dermatol* [Internet]. 2010;28(5):568–74. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clindermatol.2010.04.005>

Bergman R, Khamaysi K, Khamaysi Z, Ben Arie Y. A study of histologic and immunophenotypical staining patterns in cutaneous lymphoid hyperplasia. *J Am Acad Dermatol* [Internet]. 2011;65(1):112–24. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaad.2010.07.003>

Boudova L, Kazakov D V, Sima R, Vanecek T, Torlakovic E, Lamovec J, et al. Cutaneous Lymphoid Hyperplasia and Other Lymphoid Infiltrates of the Breast Nipple. *Am J Dermatopathol* [Internet]. outubro de 2005;27(5):375–86. Available at: <https://journals.lww.com/00000372-200510000-00001>

Bradford PT, Devesa SS, Anderson WF, Toro JR. Cutaneous lymphoma incidence patterns in the United States: A population-based study of 3884 cases. *Blood* [Internet]. 2009 [citado 19 de setembro de 2021];113(21):5064–73. Available at: <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2008-10-184168>

van der Burg M, Tü Mkaya T, Boerma M, De Bruin-Versteeg S, Langerak AW, Van Dongen JJM. Ordered recombination of immunoglobulin light chain genes occurs at the IGK locus but seems less strict at the IGL locus. 2001 [citado 6 de outubro de 2021]; Available at: <http://ashpublications.org/blood/article-pdf/97/4/1001/1671621/h8040101001.pdf>

Carvalhana S, Gonçalves A, Velosa J. Cutaneous Pseudolymphoma in a Patient With Crohn's Disease Under Infliximab. *J Clin Gastroenterol* [Internet]. maio de 2016;50(5):436–7. Available at: <https://journals.lww.com/00004836-201605000-00018>

Cerroni L. Past, present and future of cutaneous lymphomas. *Semin Diagn Pathol* [Internet]. 2017;34(1):3–14. Available at: <http://dx.doi.org/10.1053/j.semdp.2016.11.001>

Cerroni L. *Skin lymphoma : the illustrated guide*. Fifth Edit. 2020 John Wiley & Sons Ltd; 2020.

Çetinözman F, Jansen PM, Willemze R. Expression of Programmed Death-1 in Primary Cutaneous CD4-Positive Small/Medium-Sized Pleomorphic T-Cell Lymphoma, Cutaneous Pseudo-T-Cell Lymphoma, and Other Types of Cutaneous T-Cell Lymphoma. *Am J Surg Pathol* [Internet]. janeiro de 2012;36(1):109–16. Available at: <https://journals.lww.com/00000478-201201000-00015>

Colli C, Leinweber B, Müllegger R, Chott A, Kerl H, Cerroni L. *Borrelia burgdorferi* - associated lymphocytoma cutis: clinicopathologic, immunophenotypic, and molecular study of 106 cases. *J Cutan Pathol* [Internet]. março de 2004;31(3):232–40. Available at: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.0303-6987.2003.00167.x>

Comfere N, Sundram U, Hurley MY, Swick B. Views of dermatopathologists about clonality assays in the diagnosis of cutaneous T-cell and B-cell lymphoproliferative disorders. *J Cutan Pathol*. 2018;45(1):39–47.

Cossman J, Zehnauer B, Garrett CT, Smith LJ, Williams M, Jaffe ES, et al. Gene Rearrangements in the Diagnosis of Lymphoma/Leukemia: Guidelines for Use Based on a Multiinstitutional Study. *Am J Clin Pathol* [Internet]. 1 de março de 1991;95(3):347–54. Available at: <https://academic.oup.com/ajcp/article/95/3/347/1860061>

Czuczman M, Straus D, Gribben J, Bredendfeld H, Friedberg J, Bollard C. Management options, survivorship, and emerging treatment strategies for follicular and Hodgkin lymphomas. *Leuk Lymphoma* [Internet]. 27 de agosto de 2010;51(sup1):41–9. Available at: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/10428194.2010.500083>

Dayrit JF, Wang W-L, Goh SGN, Ramdial PK, Lazar AJF, Calonje E. T-cell-rich angiomatoid polypoid pseudolymphoma of the skin: a clinicopathologic study of 17 cases and a proposed nomenclature. *J Cutan Pathol* [Internet]. junho de 2011;38(6):475–82. Available at: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1600-0560.2011.01680.x>

Delves PJ, Roitt IM. *The Immune System*. Mackay IR, Rosen FS, organizadores. *N Engl J Med* [Internet]. 6 de julho de 2000;343(1):37–49. Available at: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJM200007063430107>

Deonizio JMD, Guitart J. The Role of Molecular Analysis in Cutaneous Lymphomas. *Semin Cutan Med Surg* [Internet]. 2012;31(4):234–40. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.sder.2012.08.006>

Dippel E, Assaf C, Becker JC, von Bergwelt-Baildon M, Beyer M, Cozzio A, et al. S2k Guidelines - Cutaneous Lymphomas Update 2016 - Part 1: Classification and Diagnosis (ICD10 C82 - C86). *J Dtsch Dermatol Ges*. 2017;15(12):1266–73.

Diss TC, Liu HX, M Q Du PGI. Improvements to B cell clonality analysis using PCR amplification of immunoglobulin light chain genes. *Mol Pathol* [Internet]. 1 de abril de 2002;55(2):98–101. Available at: <https://mp.bmj.com/lookup/doi/10.1136/mp.55.2.98>

Diss TC, Pan L, Peng H, Wotherspoon AC, Isaacson PG. Sources of DNA for detecting B cell monoclonality using PCR. *Clin Pathol* [Internet]. 1994;47:493–6. Available at: <http://jcp.bmj.com/>

Dojcinov SD, Path FRC, Venkataraman G, Raffeld M, Pittaluga S, Jaffe ES. EBV Positive Mucocutaneous Ulcer-A study of 26 cases associated with various sources of immunosuppression HHS Public Access. *Am J Surg Pathol*. 2010;34(3):405–17.

van Dongen JJ, Wolvers-Tettero IL. Analysis of immunoglobulin and T cell receptor genes. Part II: Possibilities and limitations in the diagnosis and management of lymphoproliferative diseases and related disorders. *Clin Chim Acta* [Internet]. abril de 1991;198(1–2):93–174. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1863986>

van Dongen JJM, Langerak AW, Brüggemann M, Evans PAS, Hummel M, Lavender FL, et al. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: Report of the BIOMED-2 concerted action BMH4-CT98-3936. *Leukemia*. 2003;17(12):2257–317.

Dumont M, Battistella M, Ram-Wolff C, Bagot M, de Masson A. Diagnosis and treatment of primary cutaneous b-cell lymphomas: State of the art and perspectives. *Cancers (Basel)*. 2020;12(6):1–21.

Elder D, Massi D, Scolyer R, Willemze R. WHO Classification of Skin Tumours. 4th ed. Lyon. IARC. 2018;

Engin B, Songür A, Kutlubay Z, Serdaroğlu S. Lymphocytic infiltrations of face. *Clin Dermatol* [Internet]. janeiro de 2014;32(1):101–8. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0738081X13000989>

Fan H, Robetorye RS. Detection of Clonal Immunoglobulin Heavy Chain Gene Rearrangements by the Polymerase Chain Reaction and Capillary Gel Electrophoresis. In 2013. p. 151–67. Available at: http://link.springer.com/10.1007/978-1-62703-357-2_10

Felcht M, Booken N, Stroebel P, Goerdts S, Klemke CD. The value of molecular diagnostics in primary cutaneous B-cell lymphomas in the context of clinical findings, histology, and

immunohistochemistry. *J Am Acad Dermatol* [Internet]. 2011;64(1):135-143.e4. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaad.2009.12.062>

Fernandez-Flores A. Cutaneous MALT-lymphoma: From cutaneous immunocytoma and pseudolymphoma to the current (and future) conceptions. *Rom J Morphol Embryol*. 2013;54(1):7–12.

Fernández-Guarino M, Ortiz-Romero PL, Fernández-Misa R, Montalbán C. Rituximab en el tratamiento de los linfomas cutáneos B primarios: revisión. *Actas Dermosifiliogr* [Internet]. junho de 2014;105(5):438–45. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0001731013000355>

Ferreri AJM, Campo E, Seymour JF, Willemze R, Ilariucci F, Ambrosetti A, et al. Intravascular lymphoma: clinical presentation, natural history, management and prognostic factors in a series of 38 cases, with special emphasis on the ‘cutaneous variant’ 1. *Br J Haematol* [Internet]. outubro de 2004;127(2):173–83. Available at: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2141.2004.05177.x>

Fried I, Wiesner T, Cerroni L. Pretibial Lymphoplasmacytic Plaque in Children. *Arch Dermatol* [Internet]. 1 de janeiro de 2010;146(1). Available at: <http://archderm.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/archdermatol.2009.341>

Gauci M-L, Quero L, Ram-Wolff C, Guillerm S, M'Barek B, Lebbé C, et al. Outcomes of radiation therapy of indolent cutaneous B-cell lymphomas and literature review. *J Eur Acad Dermatology Venereol* [Internet]. outubro de 2018;32(10):1668–73. Available at: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jdv.14972>

Gong JZ, Zheng S, Chiarle R, De Wolf-Peeters C, Palestro G, Frizzera G, et al. Detection of Immunoglobulin κ Light Chain Rearrangements by Polymerase Chain Reaction. *Am J Pathol* [Internet]. agosto de 1999;155(2):355–63. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002944010651322>

Goyal A, Carter JB, Pashtan I, Gallotto S, Wang I, Isom S, et al. Very low-dose versus standard dose radiation therapy for indolent primary cutaneous B-cell lymphomas: A retrospective study. *J Am Acad Dermatol* [Internet]. fevereiro de 2018;78(2):408–10. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0190962217321850>

Goyal A, LeBlanc RE, Carter JB. Cutaneous B-Cell Lymphoma. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2019;33(1):149–61.

Grange F, Beylot-Barry M, Courville P, Maubec E, Bagot M, Vergier B, et al. Primary Cutaneous Diffuse Large B-Cell Lymphoma, Leg Type. *Arch Dermatol* [Internet]. 1 de setembro de 2007;143(9). Available at: <http://archderm.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/archderm.143.9.1144>

Hsiao P-F, Wu Y-H. Angioplasmodocellular hyperplasia: A clinicopathologic study of 10 patients. *J Am Acad Dermatol* [Internet]. março de 2011;64(3):542–7. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0190962210003932>

Hughes J, Weston S, Bennetts B, Prasad M, Angulo R, Jaworski R, et al. The application of a PCR technique for the detection of immunoglobulin heavy chain gene rearrangements in fresh or paraffin-embedded skin tissue. *Pathology*. 2001;33(2):222–5.

Hussein MRA. Atypical lymphoid proliferations: The Pathologist's viewpoint. *Expert Rev Hematol*. 2013a;6(2):139–53.

Hussein MRA. Cutaneous pseudolymphomas: inflammatory reactive proliferations. *Expert Rev Hematol* [Internet]. 10 de dezembro de 2013b;6(6):713–33. Available at: <http://dx.doi.org/10.1586/17474086.2013.845000>

Kaddu S, Cerroni L, Pilatti A, Soyer HP, Kerl H. Acral pseudolymphomatous angiokeratoma. A variant of the cutaneous pseudolymphomas. *Am J Dermatopathol* [Internet]. abril de 1994;16(2):130–3. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8030763>

Kempf W. CD30+ lymphoproliferative disorders: histopathology, differential diagnosis, new variants, and simulators. *J Cutan Pathol* [Internet]. fevereiro de 2006;33(S1):58–70. Available at: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.0303-6987.2006.00548.x>

Kempf W, Keller K, John H, Dommann-Scherrer C. Benign Atypical Intravascular CD30+ T-Cell Proliferation: A Recently Described Reactive Lymphoproliferative Process and Simulator of Intravascular Lymphoma. *Am J Clin Pathol* [Internet]. 1 de novembro de 2014;142(5):694–9. Available at: <https://academic.oup.com/ajcp/article/142/5/694/1761563>

Kempf W, Mitteldorf C. Pathologic Diagnosis of Cutaneous Lymphomas. *Dermatol Clin* [Internet]. 2015;33(4):655–81. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.det.2015.05.002>

Kibbi A-G, Scrimanti RJ, Koenig RR, Jr MCM. A Solitary Nodule of the Left Cheek. *Arch Dermatol* [Internet]. 1 de agosto de 1988;124(8):1275. Available at: <http://archderm.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/archderm.1988.01670080087027>

Kim YH, Willemze R, Pimpinelli N, Whittaker S, Olsen EA, Ranki A, et al. TNM classification system for primary cutaneous lymphomas other than mycosis fungoides and Sézary syndrome: a proposal of the International Society for Cutaneous Lymphomas (ISCL) and the Cutaneous Lymphoma Task Force of the European Organization of Resear. *Blood* [Internet]. 15 de julho de 2007;110(2):479–84. Available at: <https://ashpublications.org/blood/article/110/6/1713/24087/Revisions-to-the-staging-and-classification-of>

Kulow BF, Cualing H, Steele P, VanHorn J, Breneman JC, Mutasim DF, et al. Progression of cutaneous B-cell pseudolymphoma to cutaneous B-cell lymphoma. *J Cutan Med Surg*. 2002;6(6):519–28.

Kwon YK, Jha RC, Etesami K, Fishbein TM, Ozdemirli M, Desai CS. Pseudolymphoma (reactive lymphoid hyperplasia) of the liver: A clinical challenge. *World J Hepatol*. 2015;7(26):2696–702.

Landa NG, Zelickson BD, Peters MS, Muller SA, Pittelkow MR. Lymphoma versus pseudolymphoma of the skin: Gene rearrangement study of 21 cases with clinicopathologic correlation. *J Am Acad Dermatol* [Internet]. 1993;29(6):945–53. Available at: [http://dx.doi.org/10.1016/0190-9622\(93\)70272-U](http://dx.doi.org/10.1016/0190-9622(93)70272-U)

Langerak AW, Groenen PJTA, Brüggemann M, Beldjord K, Bellan C, Bonello L, et al. EuroClonality/BIOMED-2 guidelines for interpretation and reporting of Ig/TCR clonality testing in suspected lymphoproliferations. *Leukemia*. 2012;26(10):2159–71.

Langerak AW, Van Krieken JHJM, Wolvers-Tettero LM, Kerkhof E, Mulder AH, Vrints WMA, et al. The role of molecular analysis of immunoglobulin and T cell receptor gene rearrangements in the diagnosis of lymphoproliferative disorders. *J Clin Pathol* [Internet]. 1 de julho de 2001;54(7):565–7. Available at: <http://jcp.bmj.com/cgi/doi/10.1136/jcp.54.7.565>

Lee SE, Kang SY, Yoo HY, Kim SJ, Kim WS, Ko YH. Clonal relationships in recurrent B-cell lymphomas. *Oncotarget*. 2016;7(11):12359–71.

Lima M. Cutaneous primary B-cell lymphomas: From diagnosis to treatment. *An Bras Dermatol*. 2015;90(5):687–706.

López Aventín D, Gallardo F, Colomo L, Moragón E, Vela MC, Duran Jordà X, et al. Diagnostic Value of Genotypic Analysis in Primary Cutaneous Lymphomas using Standardized BIOMED-2 Polymerase Chain Reaction Protocols: Experience in Daily Clinical Practice. *Acta Derm Venereol* [Internet]. 19 de maio de 2021;101(5):adv00460. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33954802>

Lukowsky A, Marchwat M, Sterry W, Gellrich S. Evaluation of B-cell clonality in archival skin biopsy samples of cutaneous B-cell lymphoma by immunoglobulin heavy chain gene polymerase chain reaction. *Leuk Lymphoma*. 2006;47(3):487–93.

Magro CM, Daniels BH, Crowson AN. Drug induced pseudolymphoma. *Semin Diagn Pathol* [Internet]. 2018;35(4):247–59. Available at: <http://dx.doi.org/10.1053/j.semdp.2017.11.003>

van Maldegem F, Van Dijk R, Wormhoudt TAM, Kluin PM, Willemze R, Cerroni L, et al. The majority of cutaneous marginal zone B-cell lymphomas expresses class-switched immunoglobulins and develops in a T-helper type 2 inflammatory environment. *Blood*. 2008;112(8):3355–61.

Melotti CZ, Amary MFC, Sotto MN, Diss T, Sanches JA. Polymerase chain reaction-Based clonality analysis of cutaneous B-cell lymphoproliferative processes. *Clinics*. 2010;65(1):53–60.

Miguel D, Peckruhn M, Elsner P. Treatment of cutaneous pseudolymphoma: A systematic review. *Acta Derm Venereol*. 2018;98(3):310–7.

Mitteldorf C, Kempf W. Cutaneous Pseudolymphoma. *Surg Pathol Clin* [Internet]. 2017;10(2):455–76. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.path.2017.01.002>

Mitteldorf C, Kempf W. Cutaneous pseudolymphoma—A review on the spectrum and a proposal for a new classification. *J Cutan Pathol*. 2020;47(1):76–97.

Mitteldorf C, Palmedo G, Kutzner H, Kauer F, Prestin M, Schuster C, et al. Diagnostic approach in lymphoplasmacytic plaque. *J Eur Acad Dermatology Venereol* [Internet]. novembro de 2015;29(11):2206–15. Available at: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jdv.13213>

Morales A V, Arber DA, Seo K, Kohler S, Kim YH, Sundram UN. Evaluation of B-cellclonality using the BIOMED-2 PCR method effectively distinguishes cutaneous B-cell lymphoma from benign lymphoid infiltrates. *Am J Dermatopathol* [Internet]. outubro de 2008;30(5):425–30. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18806482>

Moulounguet I, Ghnassia M, Molina T, Fraitag S. Miliarial-type perifollicular B-cell pseudolymphoma (lymphocytoma cutis): A misleading eruption in two women. *J Cutan Pathol*. 2012;39(11):1016–21.

Murase T, Yamaguchi M, Suzuki R, Okamoto M, Sato Y, Tamaru JI, et al. Intravascular large B-cell lymphoma (IVLBCL): A clinicopathologic study of 96 cases with special reference to the immunophenotypic heterogeneity of CD5. *Blood* [Internet]. 2007;109(2):478–85. Available at: <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2006-01-021253>

Nihal M, Mikkola D, Wood GS. Detection of clonally restricted immunoglobulin heavy chain gene rearrangements in normal and lesional skin: Analysis of the B cell component of the skin-associated lymphoid tissue and implications for the molecular diagnosis of cutaneous B cell lymphomas. *J Mol Diagnostics* [Internet]. 2000;2(1):5–10. Available at: [http://dx.doi.org/10.1016/S1525-1578\(10\)60609-5](http://dx.doi.org/10.1016/S1525-1578(10)60609-5)

Nikiforova MN, Hsi ED, Braziel RM, Gulley ML, Leonard DGB, Nowak JA, et al. Detection of Clonal IGH Gene Rearrangements: Summary of Molecular Oncology Surveys of the College of American Pathologists. *Arch Pathol Lab Med* [Internet]. 1 de fevereiro de 2007;131(2):185–9. Available at: <https://meridian.allenpress.com/aplm/article/131/2/185/460090/Detection-of-Clonal-IGH-Gene-Rearrangements>

Noor Haslina MN, Marini R, Rosnah B, Shafini MY, Wan Haslindawani WM, Mohd Nazri H, et al. Immunoglobulin Heavy Chain Gene Rearrangement in Non B-cell Haematological Malignancies. *West Indian Med J* [Internet]. novembro de 2013;62(8):701–4. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25014854>

Oertel M, Elsayad K, Weishaupt C, Steinbrink K, Eich HT. De-escalated radiotherapy for indolent primary cutaneous B-cell lymphoma. *Strahlentherapie und Onkol* [Internet]. 22 de fevereiro de 2020;196(2):126–31. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s00066-019-01541-7>

Olsen EA. Evaluation, Diagnosis, and Staging of Cutaneous Lymphoma. *Dermatol Clin* [Internet]. 2015;33(4):643–54. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.det.2015.06.001>

Olsen EA, Whittaker S, Willemze R, Pinter-Brown L, Foss FM, Geskin LJ, et al. Primary Cutaneous Lymphoma: Recommendations for Clinical Trial Design and Staging Update from the ISCL, USCLC, and EORTC. *Blood* [Internet]. 10 de novembro de 2021; Available at: <https://ashpublications.org/blood/article/doi/10.1182/blood.2021012057/477944/Primary-Cutaneous-Lymphoma-Recommendations-fo>

Orwat DE, Batalis NI. Intravascular Large B-Cell Lymphoma. *Arch Pathol Lab Med* [Internet]. 1 de março de 2012;136(3):333–8. Available at: <http://meridian.allenpress.com/doi/pdf/10.5858/arpa.2010-0747-RS>

Ploysangam T, Breneman DL, Mutasim DF. Cutaneous pseudolymphomas. *J Am Acad Dermatol* [Internet]. junho de 1998;38(6 D):877–98. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9631994>

Pimpinelli N, Olsen EA, Santucci M, Vonderheid E, Haeffner AC, Stevens S, et al. Defining early mycosis fungoides. *J Am Acad Dermatol* [Internet]. dezembro de 2005;53(6):1053–63. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0190962205027106>

Riveiro-Falkenbach E, Fernández-Figueras MT, Rodríguez-Peralto JL. Benign Atypical Intravascular CD30+ T-cell Proliferation. *Am J Dermatopathol* [Internet]. abril de 2013;35(2):143–50. Available at: <https://journals.lww.com/00000372-201304000-00001>

Roepman P, Boots CM, Scheidel KC, Sprong T, De Bruin P, De Weerd O, et al. Molecular clonality assessment shows high performance to predict malignant B-cell non-Hodgkin's lymphoma using cytological smears. *J Clin Pathol*. 2016;69(12):1109–15.

Romero-Pérez D, Blanes Martínez M, Encabo-Durán B. Cutaneous Pseudolymphomas. *Actas Dermosifiliogr*. 2016;107(8):640–51.

Safa G, Luce K, Darrieux L, Tisseau L, Ortonne N. Erythrodermic CD8+ pseudolymphoma during infliximab treatment in a patient with psoriasis: Use of cyclosporine as a rescue therapy. *J Am Acad Dermatol* [Internet]. outubro de 2014;71(4):e149–50. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0190962214015291>

Sanguenza O, Yadav S, White CJ, Brazier R. Evolutions of B-cell lymphoma from pseudolymphoma. Vol. 14, *The American Journal of Dermatopathology*. 1992. p. 408–13.

Scheijen B, Meijers RWJ, Rijntjes J, van der Klift MY, Möbs M, Steinhilber J, et al. Next generation sequencing of immunoglobulin gene rearrangements for clonality assessment: a technical feasibility study by EuroClonality-NGS. *Leukemia* [Internet]. 13 de setembro de 2019;33(9):2227–40. Available at: <http://www.nature.com/articles/s41375-019-0508-7>

Senff NJ, Hoefnagel JJ, Jansen PM, Vermeer MH, Van Baarlen J, Blokx WA, et al. Reclassification of 300 primary cutaneous B-cell lymphomas according to the new WHO-EORTC classification for cutaneous lymphomas: Comparison with previous classifications and identification of prognostic markers. *J Clin Oncol*. 2007;25(12):1581–7.

Senff NJ, Noordijk EM, Kim YH, Bagot M, Berti E, Cerroni L, et al. European Organization for Research and Treatment of Cancer and International Society for Cutaneous Lymphoma consensus recommendations for the management of cutaneous B-cell lymphomas. *Blood* [Internet]. 1 de setembro de 2008;112(5):1600–9. Available at: <https://ashpublications.org/blood/article/112/5/1600/25485/European-Organization-for-Research-and-Treatment>

Senff NJ, Zoutman WH, Vermeer MH, Assaf C, Berti E, Cerroni L, et al. Fine-Mapping Chromosomal Loss at 9p21: Correlation with Prognosis in Primary Cutaneous Diffuse Large B-Cell Lymphoma, Leg Type. *J Invest Dermatol* [Internet]. 2009;129:1149–55. Available at: www.jidonline.org

Shadrach B, Warshawsky I. A Comparison of Multiplex and Monoplex T-Cell Receptor Gamma PCR. *Diagnostic Mol Pathol* [Internet]. setembro de 2004;13(3):127–34. Available at: <http://journals.lww.com/00019606-200409000-00001>

Sokol L, Naghashpour M, Glass LF. Primary Cutaneous B-Cell Lymphomas: Recent Advances in Diagnosis and Management. *Cancer Control* [Internet]. julho de 2012;19(3):236–44. Available at: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/107327481201900308>

Suárez AL, Pulitzer M, Horwitz S, Moskowitz A, Querfeld C, Myskowski PL. Primary cutaneous B-cell lymphomas: Part I. Clinical features, diagnosis, and classification. *J Am Acad Dermatol*. 2013;69(3):329.e1-329.e13.

Swerdlow SH, Quintanilla-Martinez L, Willemze R, Kinney MC. Cutaneous B-cell lymphoproliferative disorders report of the 2011 society for hematopathology/European association for haematopathology workshop. *Am J Clin Pathol*. 2013;139(4):515–35.

Tian Z, Shiyu Z, Tao W, Li L, Yuehua L, Hongzhong J. Lymphoma or pseudolymphoma: A report of six cases and review of the literature. *Dermatol Ther*. 2019;32(4).

Uhara H, Saida T, Ikegawa S, Yamazaki Y, Mikoshiba H, Nijoh S, et al. Primary Cutaneous Plasmacytosis: Report of Three Cases and Review of the Literature. *Dermatology* [Internet]. 1994;189(3):251–5. Available at: <https://www.karger.com/Article/FullText/246848>

Vitiello P, Sica A, Ronchi A, Caccavale S, Franco R, Argenziano G. Primary Cutaneous B-Cell Lymphomas: An Update. *Front Oncol*. 2020;10(May):1–7.

van Vloten W, Willemze R. The many faces of lymphocytoma cutis. *J Eur Acad Dermatology Venereol* [Internet]. janeiro de 2003;17(1):3–6. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1468-3083.2003.00482.x>

Wagner G, Rose C, Klapper W, Sachse MM. Cutaneous and systemic plasmacytosis. *JDDG - J Ger Soc Dermatology*. 2013;11(12):1161–7.

Wagner G, Rose C, Sachse MM. Papular pseudolymphoma of adults as a variant of acral pseudolymphomatous angiokeratoma of children (APACHE). *JDDG J der Dtsch Dermatologischen Gesellschaft* [Internet]. maio de 2014;12(5):423–4. Available at:

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/ddg.12291>

Watanabe S. Systemic plasmacytosis. A syndrome of peculiar multiple skin eruptions, generalized lymphadenopathy, and polyclonal hypergammaglobulinemia. *Arch Dermatol* [Internet]. 1 de novembro de 1986;122(11):1314–20. Available at: <http://archderm.ama-assn.org/cgi/doi/10.1001/archderm.122.11.1314>

Willemze R, Cerroni L, Kempf W, Berti E, Facchetti F, Swerdlow SH, et al. The 2018 update of the WHO-EORTC classification for primary cutaneous lymphomas. *Blood*. 2019;133(16):1703–14.

Willemze R, Hodak E, Zinzani PL, Specht L, Ladetto M. Primary cutaneous lymphomas: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2018;29(June):iv30–40.

Willemze R, Jaffe ES, Burg G, Cerroni L, Berti E, Swerdlow SH, et al. WHO-EORTC classification for cutaneous lymphomas. *Blood*. 2005;105(10):3768–85.

Xu D, Yang Z, Zhang D, Wu W, Guo Y, Chen Q, et al. Rapid detection of immunoglobulin heavy chain gene rearrangement by PCR and melting curve analysis using combined FR2 and FR3 primers. *Diagn Pathol*. 2015;10(1):1–9.

Zsikla V, Baumann M, Cathomas G. Effect of buffered formalin on amplification of DNA from paraffin wax embedded small biopsies using real-time PCR. *J Clin Pathol* [Internet]. 1 de junho de 2004;57(6):654–6. Available at: <http://jcp.bmj.com/cgi/doi/10.1136/jcp.2003.013961>

APÊNDICES

APÊNDICE A - Ficha de dados obtidos através de revisão de prontuário

Ficha de dados obtidos através de revisão de prontuário			
Paciente:			
Matrícula:			
Data da Admissão:			
Sexo: <input type="checkbox"/> masculino <input type="checkbox"/> feminino			
Idade:			
Data de nascimento:			
Raça/Cor: <input type="checkbox"/> Branco <input type="checkbox"/> Pardo <input type="checkbox"/> Negro <input type="checkbox"/> Amarelo			
Tempo de história:			
Doença cutânea pregressa: <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim (Qual:)			
Comorbidades: <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim Qual:			
Tempo de seguimento:			
Data do último atendimento:			
Estado na última avaliação:			
<input type="checkbox"/> Com evidência de doença (CED)			
<input type="checkbox"/> Sem evidência de doença (SED)			
Exame dermatológico:			
Linfonodomegalias: <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim			
Locais das linfonodomegalias:			
Hepatomegalia: <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim			
Esplenomegalia: <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim			
Hemograma:			
DHL:			
Sorologia HIV:			
Sorologia HTLV:			
Sorologia para Borrelia:			
Pesquisa de clonalidade B:			
Pele	<input type="checkbox"/> Positiva	<input type="checkbox"/> Negativa	<input type="checkbox"/> não realizado
Parafina	<input type="checkbox"/> Positiva	<input type="checkbox"/> Negativa	<input type="checkbox"/> não realizado
Pesquisa de clonalidade - TCR			
Pele	<input type="checkbox"/> Positiva	<input type="checkbox"/> Negativa	<input type="checkbox"/> não realizado
Sangue :	<input type="checkbox"/> Positiva	<input type="checkbox"/> Negativa	<input type="checkbox"/> não realizado
Linfonodo :	<input type="checkbox"/> Positiva	<input type="checkbox"/> Negativa	<input type="checkbox"/> não realizado
Resultado HP pele:			
HP linfonodo:			
Imagem de tórax:(data: __/__/__)			
<input type="checkbox"/> Rx <input type="checkbox"/> TC <input type="checkbox"/> PET-CT			
Imagem de abdome (data: __/__/__):			
<input type="checkbox"/> USG <input type="checkbox"/> TC <input type="checkbox"/> PET-CT			
Tratamentos realizados:			
Diagnóstico atual:			

APÊNDICE B - Critérios histopatológicos propostos de avaliação de processos linfoproliferativos cutâneos de células B no presente estudo

Critérios histopatológicos propostos	Características
Intensidade do infiltrado celular	(0) não avaliável (1) discreto/leve (2) moderado (3) intenso
Distribuição do infiltrado celular	(0) não avaliável (1) difuso (2) nodular (3) focal () perianexial () perivascular (4) intersticial /dissecção de colágeno
Extensão do infiltrado celular	Derme superior (0) ausente/não avaliável/não representável (1) presente Derme média (0) ausente/não avaliável/não representável (1) presente Derme profunda (0) ausente/não avaliável/não representável (1) presente Hipoderme/subcutâneo (0) ausente/não avaliável/não representável (1) presente
Zona de Grenz	(0) ausente (1) presente
Tamanho celular	(0) não avaliável (1) pequenas células (2) médias células (3) grandes células (4) misto
Componente inflamatório associado	(0) ausente (1) presente () neutrófilos () eosinófilos () plasmócitos () histiócitos () linfócitos T
Epidermotropismo	(0) ausente (1) presente
Foliculotropismo	(0) ausente (1) presente
Atipia celular	(0) ausente (1) leve (2) moderada (3) intensa

(continua)

Crêterios histopatológicos propostos	Características
(continua�o)	
Invasão vascular	(0) ausente (1) presente
Invasão/ destrui�o de anexos cutâneos	(0) ausente (1) presente
Mitose	(0) ausente (1) presente (2) at�pica
Ulcera�o da epiderme	(0) ausente (1) presente
Apoptose	(0) ausente (1) presente
Necrose do infiltrado	(0) ausente (1) presente
Folículos linfoides	(0) ausentes (1) raros (2) frequentes
Centros germinativos	(0) ausentes (1) raros (2) frequentes
Zonas do manto	(0) ausentes (1) raras (2) frequentes

APÊNDICE C - Critérios imuno-histoquímicos propostos de avaliação de processos linfoproliferativos cutâneos de células B no presente estudo

Marcadores celulares do painel imuno-histoquímico básico proposto	Pontuação
CD 20	(0) (1) (2) (3) (4)
CD3	(0) (1) (2) (3) (4)
CD 23	Linfócitos : (0) (1) (2) (3) (4)
	Célula folicular dendrítica: (0) (1) (2) (3) (4)
CD 10	Fora do centro germinativo: (0) (1) (2) (3) (4)
	Centro germinativo: (0) (1) (2) (3) (4)
KI67	Em células de interesse: (0) (1) (2) (3) (4)

(continua)

Marcadores celulares do painel imuno-histoquímico básico proposto	Pontuação
(continuação) BCL2	Centro germinativo: (0) (1) (2) (3) (4)
BCL6	Fora do centro germinativo: (0) (1) (2) (3) (4) Centro germinativo: (0) (1) (2) (3) (4)
CD21	Linfócitos : (0) (1) (2) (3) (4)
	Célula folicular dendrítica: (0) (1) (2) (3) (4)
Demais marcadores	(0) (1) (2) (3) (4) (NR) não realizado
Diagnóstico após avaliação imuno-histoquímica e histopatológica	() benigno () suspeito/indeterminado () maligno (subtipo ?)

APÊNDICE D - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Dados de identificação do sujeito da pesquisa

Nome:

Documento de identidade :.....

Sexo : M F

Data nascimento:/...../.....

Endereço N° APTO:Bairro:...

CidadeCEP:.....Telefone: DDD (...)

Dados de identificação do responsável legal

Nome:

Natureza (grau de parentesco, tutor, curador etc.):.....

Documento de identidade :.....

Sexo: M F

Data nascimento.:/...../.....

Endereço N° APTO:Bairro:...

CidadeCEP:.....Telefone: DDD (...)

Dados sobre a pesquisa:

TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA : Análise do rearranjo do gene de cadeias pesada e leves da imunoglobulina pela técnica de reação em cadeia de polimerase no auxílio diagnóstico de processos linfoproliferativos cutâneos de células B

Pesquisador 1: Adriana Borba Guimarães

Cargo/função: médico

Inscrição conselho regional N° 171881 SP

Unidade do HCFMUSP: Departamento de Dermatologia – 3º andar – ICHC - FMUSP

Pesquisador 2: José Antônio Sanches Júnior

Cargo/função: médico

Inscrição conselho regional N° 40625

Unidade do HCFMUSP: Departamento de Dermatologia – 3º andar – ICHC - FMUSP

Avaliação do risco da pesquisa:

risco mínimo risco médio
risco baixo risco maior

Duração da pesquisa: 24 meses

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

Estas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo, que visa comparar os resultados da análise do rearranjo do gene da Imunoglobulina pela técnica de PCR e Citometria de Fluxo em pacientes com diagnóstico de Pseudolinfoma e Linfoma Primário Cutâneo de células B. Para avaliação clínica, você será submetido a um questionário sobre a evolução de sua doença, além de um exame físico minucioso avaliando toda a pele. A coleta da biópsia de pele será feita com punch de 6 mm, com anestesia local e será puncionado num local de pele doente. Este procedimento é simples, com riscos mínimos de complicações, e será coletada com técnica asséptica.

As complicações que podem ocorrer relacionadas à biópsia de pele: complicações possíveis podem ocorrer que incluem infecção do local da biópsia, sangramento, reação ao anestésico local e desconforto.

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O investigadores responsáveis são Dr. José Antônio Sanches Júnior e Dra Adriana Guimarães, que podem ser encontradas no endereço Rua Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 155 – 5º andar – Cerqueira Cesar-São Paulo/SP - telefone(s) (11) 2661-3346 ou (11) 2661-7936. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em

contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CEP-FMUSP): Av. Dr. Arnaldo, 251 - Cerqueira César - São Paulo - SP -21º andar – sala 36- CEP: 01246-000 Tel: 3893-4401

É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição. As informações obtidas serão analisadas em conjunto com as de outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum participante do estudo. Você poderá, caso queira, ser mantido atualizado(a) sobre os resultados parciais das pesquisas. Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Os dados e o material biológico coletados serão utilizados somente para esta pesquisa.

Preenchimento pelo sujeito da pesquisa ou seu responsável legal:

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo ” Análise do rearranjo do gene das cadeias pesada e leve da imunoglobulina pela técnica de PCR e citometria de fluxo no auxílio diagnóstico de processos linfoproliferativos cutâneos de células B”.

Eu discuti com a Dr. José Antônio/ Dra Adriana sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal Data / /

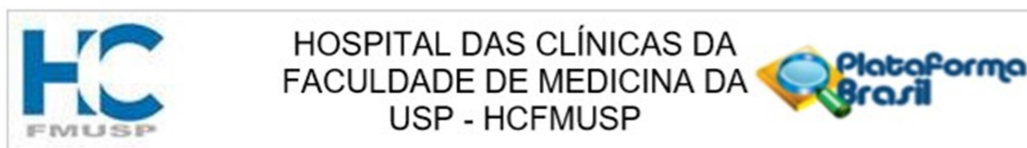
Assinatura da testemunha..... Data / /

(Para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semianalfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual).

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

APÊNDICE E - Parecer consubstanciado do CEP



Continuação do Parecer: 1.576.295

TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_linfomas_cutaneos.docx	13/04/2016 15:39:00	JOSE ANTONIO SANCHES JUNIOR	Aceito
Outros	Registro_online_14803.pdf	23/03/2016 15:16:49	JOSE ANTONIO SANCHES JUNIOR	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto.pdf	23/03/2016 15:01:40	JOSE ANTONIO SANCHES JUNIOR	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_linfomas_cutaneos.docx	08/03/2016 12:04:17	JOSE ANTONIO SANCHES JUNIOR	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 06 de Junho de 2016

Assinado por:
ALFREDO JOSE MANSUR
(Coordenador)

APÊNDICE F - Dados gerais e demográficos

Caso	Sexo	Cor	ID (A)	Data da admissão	Data da última consulta	Tempo evolução (M)	Tempo seguimento (M)	Evolução clínica	Morfologia das lesões
1	M	B	24	01/08/2005	07/05/2019	24	165	VCED	nódulo
2	F	B	43	01/03/2007	21/01/2021	3	166	VCED	nódulo
3	M	P	69	01/09/2007	26/09/2018	8	132	MCED	placa
4	F	B	69			36	153	VSED	placa nódulo
5	F	B	76	01/08/2008	06/05/2021				
5	F	B	76	01/05/2009	08/10/2019	2	125	VSED	nódulo
6	F	B	59	01/05/2009	08/12/2020	60	139	VCED	nódulo
7	M	B	49			60	60	VCED	placa pápula
7	M	B	49	01/10/2009	02/10/2014				
8	F	B	69	01/01/2010	02/03/2021	3	134	VSED	nódulo
9	M	B	40			24	130	VCED	placa nódulo
9	M	B	40	01/06/2010	06/04/2021				
10	F	B	37			12	107	VSED	pápula placa
10	F	B	37	01/04/2011	10/03/2020				
11	M	P	64			6	97	VSED	tumor ulcerado
11	M	P	64	01/09/2011	31/10/2019				
12	F	B	69			ND	1	ND	tumor ulcerado
12	F	B	69	01/11/2011	20/12/2011				
13	F	B	38			6	112	VSED	pápula placa
13	F	B	38	01/12/2011	08/04/2021				
14	M	B	52	01/12/2011	23/04/2013	60	16	ND	nódulo
15	M	P	60	01/04/2012	13/12/2021	6	116	VSED	placa
16	M	N	66			ND	65	VSED	tumor ulcerado
16	M	N	66	01/11/2012	12/04/2018				
17	F	B	63	01/01/2013	19/05/2015	12	28	VCED	pápula
18	F	I	66	01/01/2013	11/10/2016	12	45	ND	placa
19	M	B	50	01/05/2014	21/08/2018	36	51	VCED	nódulo
20	M	B	58			60	67	VCED	placa nódulo
20	M	B	58	01/09/2015	20/04/2021				
21	M	B	64			3	59	VSED	pápula placa
21	M	B	64	01/03/2016	25/02/2021				
22	M	B	33			5	58	VCED	pápula placa
22	M	B	33	01/04/2016	23/02/2021				
23	M	B	68	01/04/2016	30/03/2021	72	59	VSED	placa
24	M	B	28			6	10	ND	pápula placa
24	M	B	28	01/05/2016	28/03/2017				
25	F	B	79	01/06/2016	11/06/2019	120	36	VCED	placa
26	F	B	27	01/10/2016	23/02/2021	120	52	VCED	pápula
27	F	B	59			6	28	VCED	pápula nódulo
27	F	B	59	01/11/2016	12/03/2019				
28	M	B	36			18	52	VCED	placa nódulo
28	M	B	36	01/11/2016	11/03/2021				
29	F	B	51	01/11/2017	13/10/2020	12	35	VSED	placa
30	F	B	60			36	38	VCED	placa nódulo
30	F	B	60	01/12/2017	18/02/2021				
31	M	P	55			12	38	VCED	placa nódulo
31	M	P	55	01/02/2018	23/04/2021				
32	F	B	32	01/04/2018	02/02/2021	3	34	VSED	placa
33	M	B	65			7	33	VCED	pápula nódulo
33	M	B	65	01/05/2018	03/02/2021				
34	M	B	38	01/01/2019	12/01/2021	5	24	VSED	nódulo
35	M	B	54	01/03/2019	04/02/2020	6	11	VSED	pápula nódulo

(continua)

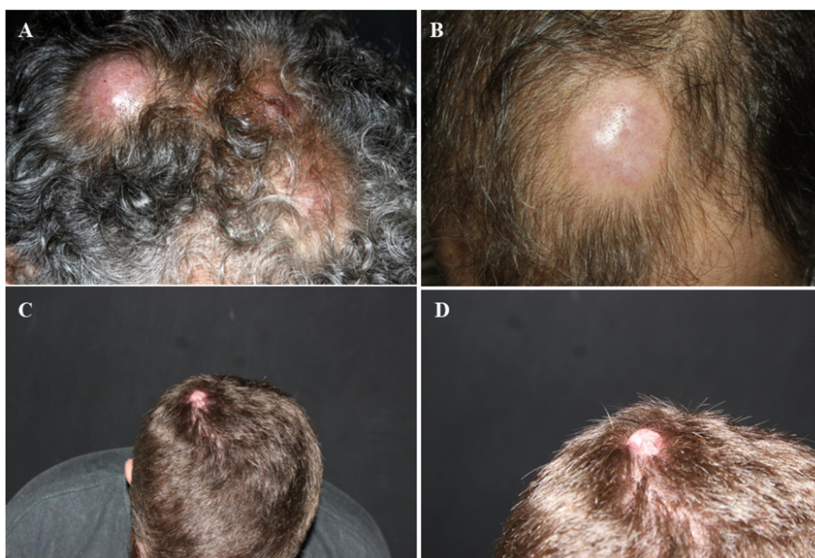
(continuação)

Caso	QTD	Topografia	Neoplasias associadas	Comorbidades	Medicamentos de uso contínuo	Estadiamento (TNM)
1	MU	tronco	não	gota, obesidade	Alopurinol, colchicina	T2a N0 M0
2	U	face	CUP em 2008	HAS, DLP	-	T1a N0 M0
3	MU	face tronco	CEC de laringe (2019)	IC	-	T2a N0 M0
4	MU	Face, tronco	não	não	não	T2b N0 M0
5	U	face	não	HAS	Anlodipino, HCTZ omeprazol	T1a N0 M0
6	MU	Tronco, braço	não	não	não	T2a N0 M0
7	MU	Face, tronco	não	-	-	T2b N3 M1
8	U	couro cabeludo	não	DM, HAS, DLP, glaucoma, gastrite	Sinvastatina, Metformina Omeprazol, Fluoxetina HCTZ	T1a N0 M0
9	MU	Braço, tronco coxa	não	não	não	T2a N0 M0
10	MU	tronco	não	HAS	Propranolol, omeprazol, AAS, losartan e HCTZ	T2a N0 M0
11	MU	perna	não	-	-	T2b N3 M0
12	MU	perna	ND	ND	ND	T2a N0 M0
13	MU	face	não	-	-	T1b N0 M0
14	MU	cabeça pescoço	não	não	não	T2b N1 M0
15	U	face	não	não	não	T1b N1 M1
16	U	tronco	ACP (2014)	não	-	T2a N1 M0
17	MU	face	não	HTO	Levotiroxina	T2a N0 M0
18	U	face	não	AR, HAS e HTO	MTX, HCTZ, enalapril, vit D e levotiroxina	T1a N0 M0
19	MU	tronco coxa	não	-	-	T2a N0 M0
20	MU	Cabeça pescoço	não	NÃO	não	T2b N0 M0
21	MU	face e tronco	não	HAS	-	T2a N0 M0
22	MU	tronco	não	-	-	T2a N0 M0
23	MU	tronco	não	AR	Adalimumabe, Abatacepte, Etanercept e CO	T2a N0 M0
24	MU	face	não	Epilepsia	Carbamazepina e lamotrigina	T2a N0 M0
25	U	tronco	não	-	-	T2a N0 M0
26	MU	face e tronco	não	SOP, NM	não	T2a N0 M0
27	MU	face e tronco	não	IDCV	Ig	T2a N0 M0
28	MU	face e tronco	não	não	-	T2a N0 M0
29	U	braço	não	DLP, pré- DM, HTO	Levotiroxina, metformina e rosuvastatina	T1a N0 M0
30	MU	face e tronco	Adenocarcinoma de cólon em 2010	não	não	T2a N0 M0
31	MU	tronco	não	não	não	T2a N0 M0
32	U	face	não	não	não	T1a N0 M0
33	MU	Face, tronco coxa	não	não	não	T3a N0 M0
34	MU	couro cabeludo	não	Doença de Crohn, HAS	Mesalazina, ácido fólico, enalapril	T2a N3 M0
35	MU	tronco	não	HAS	Losartan	T2a N0 M0

ID: idade de aquisição, A: anos, M: masculino, F: feminino, B: branca, P: parda, N: negra, I: ignorada, M: meses, QTD: quantidade de lesões, U: única, MU: múltiplas, VCED: vivo com evidência de doença, VSED: vivo sem evidência de doença, MCED: morto com evidência de doença, ND: não disponível, CUP: carcinoma urotelial papilífero, CEC: carcinoma espinocelular, ACP: Adenocarcinoma de próstata, AR: artrite reumatoide, IC: Intersticiopatia crônica, IDCV: Imunodeficiência comum variável, DM: diabetes melitus, HAS: hipertensão arterial sistêmica, HTO: hipotireoidismo DLP: dislipidemia, SOP: síndrome do ovário policístico, NM: Nódulo mamário, MUC: medicamentos de uso contínuo, HCTZ: hidroclorotiazida, AAS: ácido acetilsalicílico, Ig: imunoglobulina, CO: corticóide oral, MTX: metotrexato.

APÊNDICE G - Quadros cutâneos dos pacientes estudados

- Pacientes com nódulos em couro cabeludo. A, quadro de tumores em couro cabeludo (caso 14). B, múltiplos nódulos alopecícos em couro cabeludo (caso 20). C e D, paciente com nódulos infiltrados em couro cabeludo (caso 34).



- Tumores ulcerados em membros inferiores. A, paciente sexo feminino com tumores ulcerados em perna (caso 12). B e C, paciente do sexo masculino com tumores ulcerados em perna esquerda (caso 11).



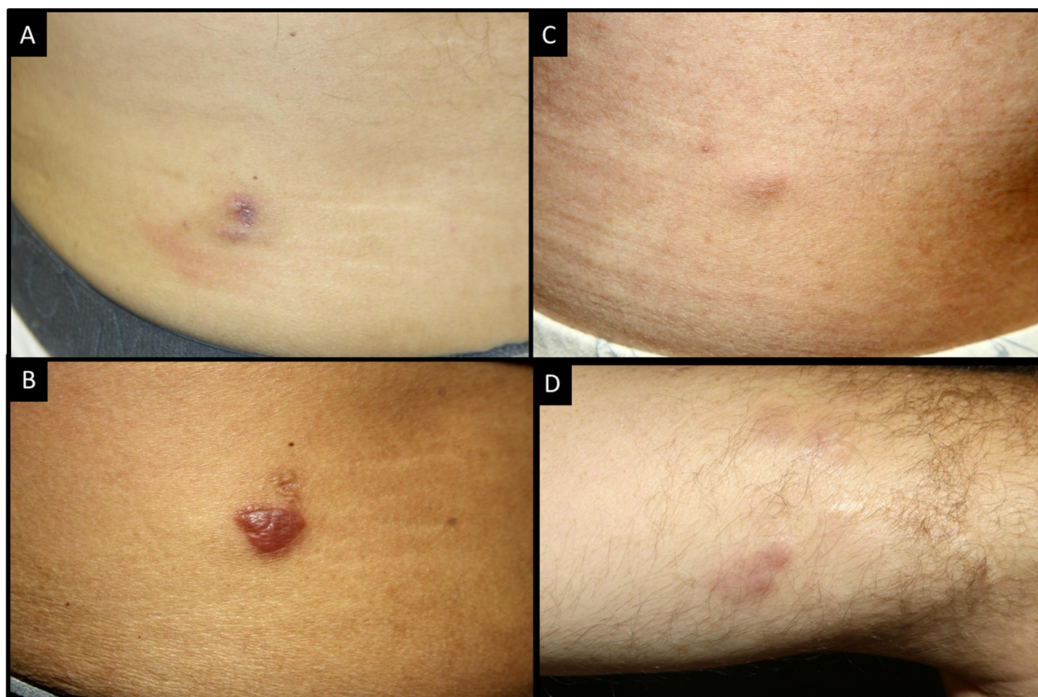
- Pacientes com lesões em face. A (caso 24), B (caso 3) e C (caso 23): pacientes com placas eritematoinfiltradas em face



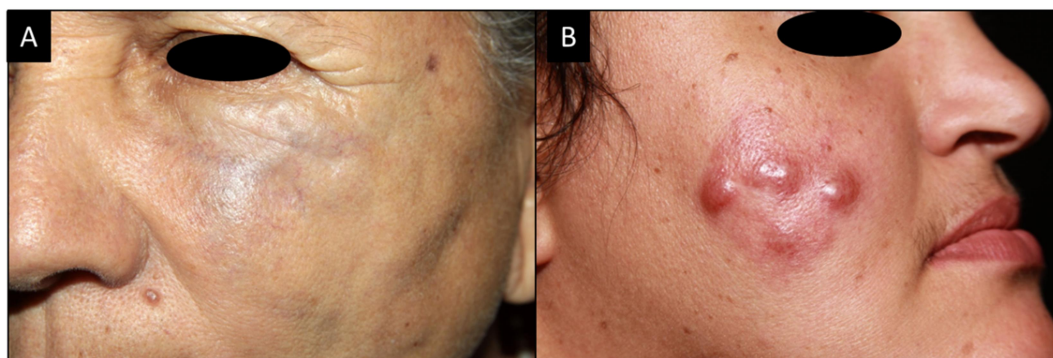
- A (caso 15) e B (caso 16): pacientes com lesões ulceradas em face e tronco



- A e B: paciente (caso 19) com nódulos eritematosos em tronco. C e D: paciente (caso 9) com nódulo e placas eritematosas em tronco e membros superiores.



- Pacientes com lesões em face. A, paciente (caso 4) com placa eritematoviolácea em face. B: paciente (caso 13) com pápulas e placa eritematosas em face.



APÊNDICE H - Resultados das escalas de pontuações dos critérios clínico-evolutivos do protocolo de investigação diagnóstica dos pacientes estudados de processos linfoproliferativos cutâneos B

Caso	Critério clínico (0 a 2)	Evolução com regressão espontânea (após abordagem) (-1 ou 0)	Evolução com persistência do quadro pós tratamento (0 ou 1)	Evolução com recidiva (0 ou 2)	Surgimento de novas lesões a despeito do tratamento (0 ou 3)	Evolução com disseminação extracutânea (0 ou 6)	Critério clínico-evolutivo
1	2	0	1	0	3	0	6
2	2	0	1	0	0	0	3
3	2	0	1	0	0	0	3
4	2	0	0	0	3	0	5
5	1	-1	0	0	0	0	0
6	2	0	1	0	3	0	6
7	2	0	0	0	3	6	11
8	1	-1	0	0	0	0	0
9	2	0	1	0	3	0	6
10	2	0	0	0	0	0	2
11	2	0	0	2	0	6	10
12	2	ND	ND	ND	ND	ND	NA
13	2	0	1	0	3	0	6
14	2	0	0	2	0	6	10
15	2	0	0	0	0	6	8
16	2	0	0	0	0	6	8
17	0	0	1	0	0	0	1
18	1	-1	0	0	0	0	0
19	2	0	0	0	3	0	5
20	2	0	1	0	0	0	3
21	2	0	1	0	0	0	3
22	2	0	1	0	0	0	3
23	2	-1	0	0	0	0	1
24	2	0	0	0	3	0	5
25	2	0	1	0	0	0	3
26	0	0	1	0	3	0	4
27	1	0	1	0	0	0	2
28	2	0	1	0	0	0	3
29	1	-1	0	0	0	0	0
30	2	0	1	0	0	0	3
31	2	0	1	0	3	0	6
32	1	-1	0	0	0	0	0
33	2	0	0	0	3	0	5
34	2	0	0	0	0	6	8
35	2	0	1	0	0	0	3

ND: não disponível. NA: não avaliável

APÊNDICE I - Resultados da revisão histopatológica

CASO	IIC	DIC	EI	ZG	TC	CIA	E	F	AC	IV	I/D	MC	UE	A	NI	FL	CG	ZM
1	3	(1-4)	(1-1-1-0)	1	4	1 HI /PL	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0
2	3	(1/2)	(0-1-1-1)	0	4	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	2	2	1
3	3	(2/3 PA)	(1-1-1-0)	0	4	0	0	0	0	0	0	1 CG	0	1 CG	0	2	2	1
4	2	(1-4)	(0-1-1-1)	NA	4	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	2	1	(1-1-0-0)	1	4	1 (HI/ EO/ PL)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	3	(2-4)	(0-1-1-0)	0	4	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	2	1	0
7	3	3 (PV) 4	(1-1-1-0)	1	3	0	0	0	2	0	0	NA	0	NA	0	0	0	0
8	2	(1-4)	(0-1-1-0)	1	2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	2	(3 PA + PV)	(1-1-1-NA)	1	1 CG A raras	1 (EO)	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
10	2	2	(0-1-1-0)	0	4	1 (HI)	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0
11	2	1	(1-1-1-0)	1	3	0	0	0	2	0	0	NA	0	NA	0	0	0	0
12	3	1	(1-1-1-0)	1	3	0	0	0	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0
13	3	(1/2/ 4)	(1-1-1-0)	1	4	1 (PL /EO)	0	0	2	0	0	0	0	0	0	2	2	0
14	3	(2-4)	(1-1-1-NA)	1	4	1 (HI)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	1
15	3	1	(1-1-1-1)	1	3	0	0	0	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0
16	3	1	(0-1-1-0)	0	3	0	0	0	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0
17	3	(1/2/3 PA+ PV /4)	(1-1-1-1)	1	1	1 (PL)	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
18	2	(2/3 PA)	(1-1-0-0)	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
19	3	(1/3 PV/4)	(1-1-1-1)	1	4	1 (PL)	0	0	2	0	0	1	0	0	0	2	1	0
20	2	2	(1-1-1-0)	1	4	1 (HI/ PL/ EO)	0	0	1	0	0	1	0	0	0	2	2	1
21	3	(2/3 PA+ PV)	(1-1-1-1)	1	3	1 (HI)	0	0	3	0	0	1	0	0	0	1	0	0
22	2	(2-4)	(1-1-1-0)	0	4	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	2	2	1
23	3	(1/2)	(1-1-1-0)	1	4	1 (EO)	0	0	0	0	0	1	0	0	0	2	2	1
24	2	3 PA+ PV	(1-1-1-0)	0	4	1 (PL/ HI)	1	1	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0
25	2	3 PV	(1-1-1-0)	0	4	1 (PL/ HI)	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
26	3	2	(1-1-1-0)	1	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2

CASO	IIC	DIC	EI	ZG	TC	CIA	E	F	AC	IV	I/D	MC	UE	A	NI	FL	CG	ZM
27	3	2	1-0) (1-1- 1-1)	1	4	0	0	0	1	0	0	2	0	0	0	2	2	2
28	3	(2-4)	(1-1- 1- NA)	1	4	1 (PL)	0	0	2	0	0	1	0	0	0	2	2	0
29	3	(1/2/ 4)	(1-1- 1-0)	1	4	1 (PL)	0	0	2 C M	0	0	1	0	0	0	2	2	0
30	3	(1-2)	(1-1- 1-1)	1	4	1 (PL)	0	0	2	0	0	1	0	0	0	2	2	1
31	3	(1/2/ 4)	(1-1- 1-1)	0	4	1 (PL)	0	0	1	0	0	0	0	0	0	2	2	1
32	2	(1/3 PA+ PV /4)	(1-1- 1-0)	0	4	1 (HI)	0	1	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0
33	3	(1/2/ 4)	(1-1- 1-1)	0	4	1 raros HI	1	0	2	0	0	1	1	0	0	2	2	2
34	3	(1/2)	(1-1- 1-1)	1	3	1 (EO /HI)	0	0	2	0	0	1	1	0	0	2	2	0
35	3	(2-4)	(1-1- 1- NA)	1	1	1 (HI)	0	0	2 C M	0	0	0	0	0	0	2	2	1

IIC: intensidade do infiltrado celular; DIC: distribuição do infiltrado celular; EI: extensão do infiltrado ;ZG: zona de Grenz , TC: Tamanho celular; CIA: Componente inflamatório associado; E: Epidermotropismo; F: Folliculotropismo; AC: Atíпия celular; IV: Invasão vascular; I/D: Invasão/destruição de anexos cutâneos; MC: Mitose celular; UE: Ulceração de epiderme, A: Apoptose; NI: Necrose do infiltrado; FL: Folículos linfoides; CG: Centros germinativos; CGA: células grandes; ZM: Zona do manto; PV: perivascular, PA: perianexial; PL: plasmócitos, PLE:periferia da lesão; HI: histiócitos; EO: eosinófilo; CM: células monocitóides; NA: não avaliável. Descrição dos Critérios Histopatológicos em Apêndice B

APÊNDICE J - Resultados da revisão imuno-histoquímica

Caso	CD 20	CD3	CD23 (Iy/ CDF)	CD10 (FCG /CG)	Ki67 (CI) (CGR)	BCL2 (CG)	BCL6 (FCG /CG)	CD4	CD5	CD21 (Iy/ CDF)	CD30
1	1 (CD e CIS)	4 (CP)	(0/0)	(0/0)	2	0	(0/0)	4	4	(0/1)	NR
2	4	2	(0/4)	(0/1)	3 (CGR)	0	(0/2)	NR	NR	(0/4)	NR
3	3	3	(0/3)	(0/2)	1	0	(0/4)	0	3	(0/3)	NR
4	4	2	(0/2)	(0/ NCG)	2	0	(2/2)	NR	NR	(0/3)	NR
5	3	3	(1/0)	(1/ NCG)	1	0 (CI)	(0/NCG)	NR	NR	(0/0)	NR
6	4	3	(4/0)	(3/N CG)	2	NCG	(2/NCG)	NR	3	(0/2)	NA
7	4	3	(0/0)	(1/ NCG)	4	2 (CI)	(0/NCG)	NR	NR	(0/0)	NR
8	4	3	(0/0)	3 (CI)	2	3(CI)	3(CI)	NR	3	(3/0)	NR
9	3	3	(2/2)	(0/0)	2	NCG	(1/NCG)	NR	3	(0/2)	NR
10	4	4	(3/1)	(0/1)	1	4	(0/0)	NR	NR	(0/4)	2
11	4	2	(0/0)	(0/ NCG)	4	0 (CI)	(0/NCG)	NR	NR	(0/0)	NR
12	4	4	(0/0)	(0/ NCG)	3	4 (CI)	(1/NCG)			(0/0)	NR
13	4	3	(4/2)	(1/2)	1	0	(2/4)	NR	3	(0/4)	NR
14	4	3	(2 em CM)/3*	(1/4)	4	0	(2/4)	NR	3	(0/4)	NR
15	4	3	(0/0)	(0/ NCG)	4	4 (CI)	(3/ NCG)	NR	NR	0/0	NR
16	4	2	(4/0)	(0/ NCG)	4	1 (CI)	(3/0)	NR	NR	(0/0)	NR
17	3	4	(0/1)	(0/0)	1	0	(2/2)	NR	4	(0/2)	NR
18	4	3	(4/1)	(0/4)	2	4	(0/4)	NR	NR	(0/4)	1
19	3	3	(1/4)	(0/1)	1	0	(2/2)	NR	NR	(0/3)	NR
20	3	3	(0/3)	(0/0)	3	0	(0/3)	3	NR	(0/3)	2
21	4	3 LP	(0/0)	(0/0)	3	0	(3/ NCG)	NR	3	(0/0)	NR
22	4	2	(0/4)	(0/0)	2	4	(0/0)	NR	2	(0/3)	NR
23	4	3	(0/0)	(0/1)	1	0	(2/4)	NR	NR	(0/4)	0
24	3	3	(0/0)	(0/ NCG)	2	NCG	(0/NCG)	3	NR	(0/0)	0
25	4	1	(2/1)	(0/ NCG)	3	0 (CI)	(1/ NCG)	NR	1	(2/1)	0
26	4	2	(0/2)	(0/2)	2	0	(0/4)	NR	NR	(0/4)	NR
27	4	2	NA	(1/4)	4	2	(1/3)	NR	NR	(0/1)	NR
28	4	3	(0/0)	(2/3)	2	0	(1/3)	NR	NR	(0/2)	NR
29	3	3	(0/4)	(1/2)	2	2 (CI)	(1/4)	NR	NR	(0/3)	NR
30	4 CD	4 CP	(4/4)	(1/3)	2	0	(3/3)	4	NR	(0/3)	1
31	4	4	(2/2)	(0/4)	3	0	(3/4)	NR	NR	(0/4)	NR
32	2	3	(0/0)	(0/0)	1	0	0	3	NR	(0/0)	NR
33	3	4	(0/3)	(0/0)	3	0	(2/3)	4	NR	(0/1)	NR
34	4	3	(0/2)	(0/2)	4	4	(2/4)	NR	0	(0/3)	NR
35	4	3	(4/0)	(0/3) CGR	2	4	(2/3)	NR	NR	(0/3)	NR

(continua)

(continuação)

Caso	CD	CD56	CD68	CD79a	CD138	Ciclina	PAX5	IgD	K	L	MUM-	DX
	43					D1					1	
1	NR	NR	NR	NR	NR	0	0	NR	NR	NR	NR	2- SOE
2	NR	NR	NR	NR	NR	0	4	NR	NR	NR	NR	2- SOE (ZM ou CF)
3	NR	NR	NR	NR	NR	0	4	NR	NR	NR	NR	0
4	NR	NR	NR	NR	NR	NR	0	NR	NR	NR	NR	2-LCF
5	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	0
6	3	NR	NR	NR	NR	0	4	NR	NR	NR	NR	2-LCF
7	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	2- DGCBLT
8	NR	NR	NR	NR	NR	0	NR	NR	NR	NR	NR	2 - LCF (BCL2 +)
9	NR	NR	NR	NR	NR	0	NR	NR	NR	NR	NR	2- LZM **
10	NR	NR	2	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	1
11	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	2- DGCBLT
12	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	2- DGCBLT
13	NR	NR	NR	NR	NR	0	NR	NR	NR	NR	NR	2-LCF
14	NR	NR	NR	NR	NR	0	NR	NR	NR	NR	NR	2-LCF
15	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	2-LCF com PD
16	NR	NR	NR	NR	NR	0	NR	NR	NR	NR	NR	2-LCF ***
17	NR	NR	NR	NR	NR	0	NR	NR	3	3	NR	1
18	NR	NR	NR	NR	NR	0	NR	NR	NR	NR	NR	2-LCF
19	NR	NR	3	NR	NR	0	4	NR	2	1	NR	2- LZM
20	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	1
21	NR	NR	NR	4	NR	0	2	NR	NR	NR	0	2- LCF
22	NR	NR	NR	NR	0	0	NR	4	NR	NR	NR	1
						(raros PL)						
23	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	1
24	NR	NR	NR	NR	NR	0	NR	NR	NR	NR	NR	1
25	NR	0	2	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	1
26	NR	NR	NR	NR	NR	0	NR	1	NR	NR	NR	0
27	NR	NR	NR	NR	NR	0	NR	NR	NR	NR	NR	2 - LCF
28	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	2-LCF
29	0	NR	NR	NR	0 (CI) 2 (PL)	NR	NR	2	NR	NR	NR	2- LZM
30	NR	NR	NR	NR	1	0	4	NR	NR	NR	NR	2-LCF
31	NR	NR	NR	NR	NR	0	NR	NR	NA	NA	NR	0
32	NR	NR	2	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	0
33	NR	NR	NR	NR	NR	0	NR	NR	NR	NR	NR	1
34	NR	NR	NR	NR	NR	0	4	NR	NR	NR	NR	2 - LCF ****
35	NR	NR	NR	NR	NR	0	NR	NR	NR	NR	NR	2- LZM

K:kappa, L:lambda, DX: diagnóstico; Ly:linfócitos; CDF: célula dendrítica folicular, FCG: fora do centro germinativo, CG: centro germinativo, NR: não realizado; NA: não avaliável; NCG: não tem centro germinativo; CD: células grandes, CM: células do manto; CP: células pequenas; CIS: células isoladas; LP: linfócitos pequenos, CI: células de interesse, PL: plasmócitos; CGR: centros germinativos residuais; CF: linfoma centrofolicular; ZM: linfoma de zona marginal. PD: padrão difuso. * Obs: marcação fraca porém extensa ** Outros achados: presença de células multinucleadas e poliglobuladas com nucléolo evidente nos folículos linfoides. *** Nota: com padrão difuso e presença de células grandes e ausência de folículos **** Presença de áreas foliculares e áreas difusas. Descrição dos critérios imuno-histoquímicos em Apêndice C.

APÊNDICE K - Resultados descritivos da pesquisa de clonalidade do rearranjo gênico da cadeia pesada da imunoglobulina (IgH) nos 35 casos avaliados de processos linfoproliferativos cutâneos B

Caso	IgH tubo A	IgH tubo B	IgH tubo C
1	policlonal	monoclonal	monoclonal com fundo policlonal
2	monoclonal	monoclonal com fundo policlonal	monoclonal com background policlonal
3	monoclonal	monoclonal	policlonal
4	monoclonal	monoclonal	monoclonal
5	não amplificou	não amplificou	policlonal
6	monoclonal	monoclonal com fundo policlonal	monoclonal com fundo policlonal
7	não amplificou	não amplificou	monoclonal
8	não amplificou	não amplificou	policlonal
9	policlonal	monoclonal	monoclonal
10	policlonal	monoclonal com fundo policlonal	monoclonal com fundo policlonal
11	não amplificou	não amplificou	não amplificou
12	não amplificou	não amplificou	não amplificou
13	policlonal	policlonal	policlonal
14	monoclonal	policlonal	policlonal
15	não amplificou	não amplificou	não amplificou
16	monoclonal	não amplificou	monoclonal
17	policlonal	policlonal	policlonal
18	não amplificou	inconclusivo	policlonal
19	não amplificou	não amplificou	policlonal
20	monoclonal	monoclonal	policlonal
21	policlonal	monoclonal	policlonal
22	monoclonal	policlonal	monoclonal
23	não amplificou	policlonal	policlonal
24	monoclonal	policlonal	policlonal
25	monoclonal	inconclusivo	monoclonal
26	policlonal	policlonal	policlonal
27	não amplificou	policlonal	policlonal
28	policlonal	policlonal	monoclonal com fundo policlonal
29	policlonal	monoclonal com fundo policlonal	policlonal
30	policlonal	policlonal	policlonal
31	não amplificou	monoclonal	policlonal
32	não amplificou	não amplificou	não amplificou
33	não amplificou	não amplificou	não amplificou
34	monoclonal com fundo policlonal	policlonal	policlonal
35	monoclonal	não amplificou	policlonal

APÊNDICE L - Resultados descritivos da pesquisa da clonalidade do rearranjo gênico das cadeias leves kappa e lambda da imunoglobulina (IgK e IgL) dos 35 casos avaliados de processos linfoproliferativos cutâneos B

Caso	IgK tubo A	IgK tubo B	IgL
1	policlonal	monoclonal	monoclonal
2	policlonal	policlonal	policlonal
3	policlonal	não amplificou	não amplificou
4	monoclonal	Monoclonal	não amplificou
5	inconclusivo	não amplificou	policlonal
6	monoclonal	monoclonal	policlonal
7	policlonal	não amplificou	não amplificou
8	policlonal	não amplificou	policlonal
9	monoclonal	Monoclonal	policlonal
10	policlonal	Inconclusivo	policlonal
11	monoclonal	não amplificou	não amplificou
12	monoclonal	não amplificou	não amplificou
13	policlonal	policlonal	policlonal
14	policlonal	Monoclonal	policlonal
15	monoclonal	não amplificou	não amplificou
16	policlonal	não amplificou	não amplificou
17	policlonal	policlonal	policlonal
18	monoclonal	Monoclonal	não amplificou
19	policlonal	não amplificou	policlonal
20	monoclonal	não amplificou	policlonal
21	policlonal	policlonal	policlonal
22	policlonal	Policlonal	policlonal
23	policlonal	não amplificou	policlonal
24	policlonal	Monoclonal	policlonal
25	policlonal	Monoclonal	policlonal
26	policlonal	policlonal	policlonal
27	inconclusivo	Monoclonal	policlonal
28	policlonal	Inconclusivo	policlonal
29	monoclonal	Monoclonal	policlonal
30	monoclonal	Monoclonal	monoclonal
31	policlonal	monoclonal	policlonal
32	não amplificou	não amplificou	não amplificou
33	policlonal	monoclonal	não amplificou
34	monoclonal	Policlonal	policlonal
35	Policlonal	policlonal	policlonal

APÊNDICE M - Resultados descritivos da pesquisa de rearranjo gênico de imunoglobulina por PCR dos 35 casos avaliados de processos linfoproliferativos cutâneos B

Caso	Resultado molecular de biologia por PCR	Cadeia Ig com rearranjo	Tipo de amostra cutânea avaliada
1	Monoclonal	leve(kappa e lambda) e pesada	AFFIP
2	Monoclonal	pesada	AC
3	Monoclonal	pesada	AFFIP
4	Monoclonal	leve(kappa) e pesada	AFFIP
5	Indeterminado	indeterminado	AFFIP
6	Monoclonal	leve(kappa) e pesada	AC
7	Monoclonal	pesada	AFFIP
8	Indeterminado	indeterminado	AFFIP
9	Monoclonal	leve(kappa) e pesada	AFFIP
10	Monoclonal	pesada	AFFIP
11	Monoclonal	leve (kappa)	AFFIP
12	Monoclonal	leve (kappa)	AFFIP
13	Policlonal	policlonal	AFFIP e AC
14	Monoclonal	leve(kappa) e pesada	AFFIP
15	Monoclonal	leve (kappa)	AFFIP
16	Monoclonal	pesada	AFFIP
17	Policlonal	policlonal	AC
18	Monoclonal	leve (kappa)	AFFIP
19	Indeterminado	indeterminado	AFFIP
20	Monoclonal	leve(kappa) e pesada	AFFIP
21	Monoclonal	pesada	AC
22	Monoclonal	pesada	AC
23	Indeterminado	indeterminado	AFFIP
24	Monoclonal	leve(kappa) e pesada	AFFIP
25	Monoclonal	leve(kappa) e pesada	AC
26	Policlonal	policlonal	AFFIP
27	Monoclonal	leve (kappa)	AFFIP
28	Monoclonal	pesada	AFFIP e AC
29	Monoclonal	leve(kappa) e pesada	AC
30	Monoclonal	leve(kappa e lambda)	AFFIP e AC
31	Monoclonal	leve(kappa) e pesada	AFFIP
32	não avaliável	não houve amplificação	AFFIP
33	Monoclonal	leve (kappa)	AFFIP
34	Monoclonal	leve(kappa) e pesada	AFFIP
35	Monoclonal	pesada	AC

PCR: reação em cadeia da polimerase, AC: amostra congelada, AFFIP: amostra fixada em formol e incluída em parafina.

APÊNDICE N - Resultados descritivos da pesquisa da clonalidade do rearranjo gênico do TCR γ dos 35 casos estudados de processos linfoproliferativos cutâneos B

Caso	TCR	Tipo de amostra cutânea avaliada
1	policlonal	AFFIP
2	monoclonal	AC
3	NA	AFFIP
4	policlonal	AFFIP
5	policlonal	AFFIP
6	monoclonal	AC
7	NR	-
8	NA	AFFIP
9	policlonal	AFFIP e AC
10	policlonal	AFFIP
11	NR	-
12	NR	-
13	policlonal	AFFIP e AC
14	policlonal	AFFIP
15	NR	-
16	NA	AFFIP
17	policlonal	AFFIP
18	policlonal	AFFIP
19	NA	AFFIP
20	policlonal	AC
21	policlonal	AFFIP e AC
22	policlonal	AFFIP
23	policlonal	AFFIP
24	policlonal	AFFIP
25	policlonal	AFFIP
26	policlonal	AFFIP
27	NA	AFFIP
28	policlonal	AFFIP e AC
29	policlonal	AC
30	policlonal	AFFIP e AC
31	NA	AFFIP
32	NA	AFFIP
33	NA	AFFIP
34	policlonal	AFFIP
35	policlonal	AC

TCR: receptor de células T, NA: não avaliável, NR: não realizado, AC: amostra congelada, AFFIP: amostra fixada em formol e incluída em parafina.

APÊNDICE O - Resultados das frequências e porcentagens das pontuações referentes aos critérios avaliados no protocolo de investigação diagnóstica

Resultados das frequências e porcentagens das pontuações avaliadas no critério clínico-evolutivo pelo protocolo de investigação diagnóstica

Resultados do critério clínico-evolutivo do PID	Pontuação	Frequência	Porcentagem
	-1	0	0,0%
	0	5	14,7%
	1	2	5,9%
	2	2	5,9%
	3	9	26,5%
	4	1	2,9%
	5	4	11,8%
	6	5	14,7%
	7	0	0,0%
	8	3	8,8%
	9	0	0,0%
	10	2	5,9%
	11	1	2,9%
	Total*	34	100,0%

PID: protocolo de investigação diagnóstica. Interpretação do escore de pontuação do diagnóstico clínico-evolutivo (critério A): 0 ou -1 (não compatível com linfoma), 1 a 2 (indeterminado), 3 a 5 (suspeito de linfoma), ≥ 6 (compatível com linfoma). , * Avaliação final realizada em 34 dos 35 pacientes estudados.

Resultados das frequências e porcentagens das pontuações avaliadas nos critérios HP+IHQ pelo protocolo de investigação diagnóstica

Resultados do critério HP+IHQ do PID	Pontuação	Frequência	Porcentagem
	0	5	14,3%
	1	8	22,8%
	2	22	62,9%
	Total	35	100,0%

PID: protocolo de investigação diagnóstica, HP: Histopatológico, IHQ: imuno-histoquímico. Interpretação do escore de pontuação do critério HP+IHQ: 0 (não compatível com linfoma/benigno), 1 (indeterminado), 2 (compatível com linfoma/maligno).

Resultados das frequências e porcentagens das pontuações avaliadas nos resultados da pesquisa do rearranjo gênico da imunoglobulina pelo protocolo de investigação diagnóstica

Resultados de pesquisa do rearranjo gênico da imunoglobulina pelo PID	Pontuação	Frequência	Porcentagem
	0	3	8,8%
	1	4	11,8%
	2	27	79,4%
	Total*	34*	100,0%

PID: protocolo de investigação diagnóstica. Interpretação do escore de pontuação do critério de pesquisa do rearranjo gênico da imunoglobulina: 0 (policlonal), 1 (indeterminado), 2 (monoclonal). *Avaliação realizada em 34 dos 35 pacientes estudados, pois um caso teve resultado não avaliável devido ausência de amplificação em todos os tubos avaliados

Resultados das frequências e porcentagens do somatório das pontuações finais dos critérios clínico-evolutivos, histopatológicos associado aos imunohistoquímicos e pesquisa do rearranjo gênico da imunoglobulina pelo protocolo proposto

Pontuação final dos critérios CE, HP+IHQ e pesquisa do rearranjo gênico da imunoglobulina	Pontuação	Frequência	Porcentagem
Critérios CE, HP+IHQ e pesquisa do rearranjo gênico da imunoglobulina	0	0	0,0%
	1	1	3,0%
	2	1	3,0%
	3	2	6,1%
	4	3	9,1%
	5	2	6,1%
	6	4	12,2%
	7	5	15,1%
	8	5	15,1%
	9	1	3,0%
	10	3	9,1%
	11	0	0,0%
	12	3	9,1%
	13	0	0,0%
	14	2	6,1%
	15	1	3,0%
	Total*	33	100,0%

PID: protocolo de investigação diagnóstica, CE: clínico-evolutivo, HP: Histopatológico, IHQ: imunohistoquímico. * Avaliação final completa realizada em 33 dos 35 pacientes estudados.

APÊNDICE P - Resultados da clonalidade B pela pesquisa do rearranjo gênico da imunoglobulina em relação aos resultados dos critérios histopatológicos associado a imuno-histoquímicos pelo protocolo proposto

Resultados descritivos dos resultados de clonalidade B em relação aos subtipos histológicos pelo critério de HP+IHQ dos pacientes estudados com PLPCB pelo protocolo de investigação diagnóstica

Resultados de clonalidade B (pesquisa dos rearranjos gênicos de cadeia pesada e leves da imunoglobulina)	ZM (N=4) n (%)	CF (N=13) n (%)	LCPDGCB-TP (N=3) n (%)	SOE (N=2) n (%)	Total (N=22) n (%)
Cadeia pesada	1(4,5%)	3 (13,6%)	1 (4,5%)	1 (4,5%)	6 (27,2%)
Cadeia leve kappa	-	3 (13,6%)	2 (9,1%)	-	5 (22,8%)
Cadeia leve lambda	-	-	-	-	-
Cadeias leve kappa e pesada	2 (9,1%)	4(18,2%)	-	-	6 (27,3%)
Cadeias leve lambda e pesada	-	-	-	-	-
Cadeias leves kappa e lambda	-	1(4,5%)	-	-	1 (4,5%)
Cadeias pesada e leves (kappa e lambda)	-	-	-	1 (4,5%)	1 (4,5%)
Ausência de resultado monoclonal	-	1 (4,5%)	-	-	1 (4,5%)
Indeterminado	1 (4,5%)	1 (4,5%)	-	-	2 (9,2%)
Total	4(18,1%)	13(59,1%)	3(13,6%)	2 (9,2%)	22(100%)

HP: histopatológico, IHQ: imuno-histoquímico, PLPCB: processos linfoproliferativos cutâneos B, ZM: linfoma cutâneo primário de células B tipo zona marginal, CF: linfoma cutâneo primário de células B tipo centrofolicular, LCPDGCB-TP: linfoma cutâneo primário difuso de grande célula B tipo perna, SOE: sem outra especificação.

Resultados finais de clonalidade B em relação aos casos compatíveis com linfomas cutâneos pelo critério de HP+IHQ dos pacientes estudados com PLPCB pelo protocolo de investigação diagnóstica

Resultados de clonalidade B (pesquisa dos rearranjos gênicos de cadeias pesada e leves da imunoglobulina)	ZM (N=4) n (%)	CF (N=13) n (%)	LCPDGCB-TP (N=3) n (%)	SOE (N=2) n (%)	Total (N=22) n (%)
Ausência de resultado monoclonal	-	1 (4,5%)	-	-	1 (4,5%)
Indeterminado	1 (4,5%)	1 (4,5%)	-	-	2 (9,1%)
Resultado monoclonal	3 (13,6%)	11 (50,0%)	3 (13,6%)	2 (9,2%)	19(86,4%)
Total	4 (18,1%)	13 (59,1%)	3 (13,6%)	2(9,2%)	22(100,0%)

HP: histopatológico, IHQ: imuno-histoquímico, PLPCB: processos linfoproliferativos cutâneos B, ZM: linfoma cutâneo primário de células B tipo zona marginal, CF: linfoma cutâneo primário de células B tipo centrofolicular, LCPDGCB-TP: linfoma cutâneo primário difuso de grande célula B tipo perna, SOE: sem outra especificação.

Resultados descritivos dos resultados de clonalidade B em relação aos subtipos histológicos indolentes pelo critério de HP+IHQ dos pacientes estudados com PLPCB pelo protocolo de investigação diagnóstica

Resultados de clonalidade B (pesquisa dos rearranjos gênicos de cadeias pesada e leves da imunoglobulina)	ZM (N=4) n (%)	CF (N=13) n (%)	Total (N=17) n (%)
Cadeia pesada	1 (5,9%)	3 (17,7%)	4 (23,6%)
Cadeia leve	-	3 (17,7%)	3 (17,7%)
Cadeia leve lambda	-	-	-
Cadeias leve kappa e pesada	2 (11,8%)	4 (23,6%)	6 (35,3%)
Cadeias leve lambda e pesada	-	-	-
Cadeias leves kappa e lambda	-	1 (5,9%)	1 (5,9%)
Cadeias pesada e leves (kappa e lambda)	-	-	-
Ausência de resultado monoclonal	-	1 (5,8%)	1 (5,9%)
Indeterminado	1 (5,9%)	1 (5,8%)	2 (11,8%)
Total	4 (23,6%)	13 (76,4%)	17 (100%)

HP: histopatológico, IHQ: imuno-histoquímico, PLPCB: processos linfoproliferativos cutâneos B, ZM: linfoma cutâneo primário de células B tipo zona marginal, CF: linfoma cutâneo primário de células B tipo centrofolicular, LCPDGCB-TP: linfoma cutâneo primário difuso de grande célula B tipo perna, SOE: sem outra especificação.

Resultados finais dos resultados de clonalidade B em relação aos subtipos histológicos indolentes pelo critério de HP+IHQ dos pacientes estudados com PLPCB pelo protocolo de investigação diagnóstica

Resultados de clonalidade de B	Casos (n)	Casos com resultado monoclonal pela análise isolada do rearranjo gênico de cadeia pesada de Ig n (%)	Casos com resultado monoclonal pela análise isolada do rearranjo gênico de cadeias leves de Ig n (%)	Casos com resultado monoclonal pela análise associada dos rearranjos gênicos de cadeias pesada e leves n (%)	Indeterminado pela análise associada dos rearranjos gênicos de cadeias pesada e leves n (%)	Ausência de resultado monoclonal pela análise associada dos rearranjos gênicos de cadeias pesada e leves n (%)
ZM	4	3 (75%)	2 (50%)	3 (75%)	1 (25%)	-
CF	13	7 (53,9%)	8 (61,5%)	11 (84,6%)	1 (4,5%)	1 (7,7%)
Total	17	10 (58,9%)	10 (58,9%)	14 (82,3%)	2 (20,6%)	1 (5,9%)

HP: histopatológico, IHQ: imunohistoquímico, PLPCB: processos linfoproliferativos cutâneos B, ZM: linfoma cutâneo primário de células B tipo zona marginal, CF: linfoma cutâneo primário de células B tipo centrofolicular, Ig: imunoglobulina.

Resultados finais de clonalidade B em relação aos casos compatíveis com linfomas cutâneos pelo critério de HP+IHQ dos pacientes estudados com PLPCB pelo protocolo de investigação diagnóstica

Resultados de clonalidade B	Casos (n)	Casos com resultado monoclonal pela análise isolada do rearranjo gênico de cadeia pesada de Ig n (%)	Casos com resultado monoclonal pela análise isolada do rearranjo gênico de cadeias leves de Ig n (%)	Casos com resultado monoclonal pela análise associada dos rearranjos gênicos de cadeias pesada e leves n (%)	Indeterminado pela análise associada dos rearranjos gênicos de cadeias pesada e leves n (%)	Ausência de resultado monoclonal pela análise associada dos rearranjos gênicos de cadeias pesada e leves n (%)
ZM	4	3 (75%)	2 (50%)	3 (75%)	1 (25%)	-
CF	13	7 (53,9%)	8(61,5%)	11(84,6%)	1 (7,7%)	1 (7,7%)
LCPDGCB-TP	3	1 (33,3%)	2 (66,6%)	3 (100,0%)	-	-
SOE	2	2 (100,0%)	1 (50,0%)	2 (100,0%)	-	-
Linfomas cutâneos	22	13 (59,1%)	13 (59,1%)	19 (86,3%)	2(9,1%)	1 (4,5%)

HP: histopatológico, IHQ: imunohistoquímico, PLPCB: processos linfoproliferativos cutâneos B, ZM: linfoma cutâneo primário de células B tipo zona marginal, CF: linfoma cutâneo primário de células B tipo centrofolicular, LCPDGCB-TP: linfoma cutâneo primário difuso de grande célula B tipo perna, SOE: sem outra especificação.

Resultados finais de clonalidade B em relação aos resultados pelo critério de HP+IHQ dos 35 pacientes estudados com PLPCB pelo protocolo de investigação diagnóstica

Resultados de clonalidade B	Casos (n)	Casos com resultado monoclonal pela análise isolada do rearranjo gênico de cadeia pesada de Ig n (%)	Casos com resultado monoclonal pela análise isolada do rearranjo gênico de cadeias leves de Ig n (%)	Casos com resultado monoclonal pela análise associada dos rearranjos gênicos de cadeias pesada e leves n (%)	Indeterminado pela análise associada dos rearranjos gênicos de cadeias pesada e leves n (%)	Ausência de resultado monoclonal pela análise associada dos rearranjos gênicos de cadeias pesada e leves n (%)	Resultado não avaliável pela análise associada dos rearranjos gênicos de cadeias pesada e leves n (%)
ZM	4	3 (75%)	2 (50%)	3 (75%)	1 (25%)	-	-
CF	13	7 (53,9%)	8(61,5%)	11(84,6%)	1 (7,7%)	1 (7,7%)	-
LCPDGCB-TP	3	1 (33,3%)	2 (66,6%)	3 (100,0%)	-	-	-
SOE	2	2 (50,0%)	1 (50,0%)	2 (100,0%)	-	-	-
Indeterminado	8	5 (62,5%)	4 (50,0%)	6 (75,0%)	1 (12,5%)	1(12,5%)	-
Não compatível com linfoma cutâneo	5	2 (40,0%)	1(20,0%)	2 (40,0%)	1 (20,0%)	1 (20,0%)	1 (20,0%)
Total	35	20 (57,1%)	18 (51,4%)	27 (77,1%)	4 (11,4%)	3 (8,6%)	1 (2,9%)

HP: histopatológico, IHQ: imunohistoquímico, PLPCB: processos linfoproliferativos cutâneos B, ZM: linfoma cutâneo primário de células B tipo zona marginal, CF: linfoma cutâneo primário de células B tipo

centrofolicular, LCPDGCB-TP: linfoma cutâneo primário difuso de grande célula B tipo perna, SOE: sem outra especificação

Frequência dos resultados monoclonais pela análise dos diferentes alvos do rearranjo gênico da cadeia pesada da imunoglobulina do proposto estudo de PLPCB

Resultados monoclonais da pesquisa de clonalidade pela análise do rearranjo gênico da cadeia pesada da imunoglobulina	Total (N=20) n (%)
Cadeia pesada - Tubo A (FR1-VHJH)	12/20 (60,0)
Cadeia pesada - Tubo B (FR2-VHJH)	11/20 (55,0)
Cadeia pesada - Tubo C (FR3-VHJH)	11/20 (55,0)

PLPCB: processos linfoproliferativos cutâneos de células B.

Frequência dos resultados monoclonais pela análise dos diferentes alvos dos rearranjos gênicos das cadeias leves da imunoglobulina do proposto estudo de PLPCB

Resultados monoclonais da pesquisa de clonalidade pela análise dos rearranjos gênicos das cadeias leves da imunoglobulina	Total (N=18) n (%)
Cadeia kappa - tubo A (VK-JK)	11/18 (61,1)
Cadeia kappa - tubo B (VK-Kde + intron-Kde)	13/18 (72,2)
Cadeia lambda - tubo A (Vλ-Jλ)	2/18 (11,1)

PLPCB: processos linfoproliferativos cutâneos de células B.

Resultados finais de clonalidade B pela análise do rearranjo gênico da cadeia pesada da imunoglobulina em relação aos casos compatíveis com linfomas cutâneos pelo critério de HP+IHQ dos pacientes estudados com PLPCB pelo protocolo de investigação diagnóstica

Resultados da pesquisa do rearranjo gênico da cadeia pesada da imunoglobulina	Tubo A (FR1-VHJH) n (%)	Tubo B (FR2-VHJH) n (%)	Tubo C (FR3-VHJH) n (%)
Resultado monoclonal	7 (31,8)	7 (31,8)	8 (36,4)
Resultado policlonal	7 (31,8)	6 (27,2)	11 (50)
Ausência de amplificação	8 (36,4)	8 (36,4)	3 (13,6)
Resultado inconclusivo	0 (0,0)	1 (4,6)	0 (0,0)
Total	22 (100,0)	22 (100,0)	22 (100,0)

PLPCB: processos linfoproliferativos cutâneos de células B.

Resultados finais de clonalidade B pela análise do rearranjo gênico das cadeias leves da imunoglobulina em relação aos casos compatíveis com linfomas cutâneos pelo critério de HP+IHQ dos pacientes estudados com PLPCB pelo protocolo de investigação diagnóstica

Resultados da pesquisa dos rearranjos gênicos das cadeias leves da imunoglobulina	Tubo A (VK-JK)	Tubo B (VK-Kde + intron-Kde)	Tubo A (Vλ-Jλ)
Resultado monoclonal	10 (45,4)	9 (40,9)	2 (9,1)
Resultado policlonal	11 (50,0)	5 (22,7)	13 (59,1)
Ausência de amplificação	0 (0,0)	7 (31,8)	7 (31,8)
Resultado inconclusivo	1 (4,6)	1 (4,6)	0 (0,0)
Total	22 (100,0)	22 (100,0)	22 (100,0)

PLPCB: processos linfoproliferativos cutâneos de células B.

Resultados da pesquisa de clonalidade pela análise dos diferentes alvos do rearranjo gênico da cadeia pesada da imunoglobulina do protocolo de investigação diagnóstica proposto para o estudo dos 35 pacientes de PLPCB

Resultados da pesquisa do rearranjo gênico da cadeia pesada da imunoglobulina	Tubo A (FR1-VHJH)	Tubo B (FR2-VHJH)	Tubo C (FR3-VHJH)
Resultado monoclonal	12 (34,3)	11(31,4)	11(31,4)
Resultado policlonal	10 (28,5)	12(34,3)	20 (57,1)
Ausência de amplificação	12 (34,3)	9 (25,7)	3 (8,6)
Resultado inconclusivo	0 (0,0)	2(5,7)	0 (0,0)
Resultado não avaliável	1 (2,9)	1 (2,9)	1 (2,9)
Total	35 (100)	35 (100)	35 (100)

PLPCB: processos linfoproliferativos cutâneos de células B.

Resultados da pesquisa de clonalidade pela análise dos diferentes alvos dos rearranjos gênicos das cadeias leves da imunoglobulina do protocolo de investigação diagnóstica proposto para o estudo dos 35 pacientes de PLPCB

Resultados da pesquisa dos rearranjos gênicos das cadeias leves da imunoglobulina	Tubo A (VK-JK)	Tubo B (VK-Kde + intron-Kde)	Tubo A (Vλ-Jλ)
Resultado monoclonal	11(32,4)	13(37,1)	2 (5,7)
Resultado policlonal	21(60,0)	8 (22,9)	23 (65,7)
Ausência de amplificação	0 (0,0)	11 (31,4)	9 (25,7)
Resultado inconclusivo	2 (5,7)	2 (5,7)	0 (0,0)
Resultado não avaliável	1(2,9)	1(2,9)	1 (2,9)
Total	35 (100)	35 (100)	35 (100)

PLPCB: processos linfoproliferativos cutâneos de células B.

Resultados monoclonais da pesquisa de clonalidade pela análise dos rearranjos gênicos das cadeias pesada e leves da imunoglobulina do protocolo de investigação diagnóstica proposto para o estudo de PLPCB

Resultados monoclonais da pesquisa de clonalidade pela análise dos rearranjos gênicos das cadeias pesada e leves da imunoglobulina	Total (N=27) n (%)
Apenas cadeia pesada	9/27 (33,3)
Apenas cadeias leves	7/27 (25,9)
Associação de cadeia pesada e leves	11/27 (40,8)

PLPCB: processos linfoproliferativos cutâneos de células B.

APÊNDICE Q - Resultados das escalas de pontuações dos critérios avaliados no protocolo de investigação diagnóstica dos pacientes estudados de processos linfoproliferativos cutâneos B

Caso	CE	HP+IHQ	Pesquisa de rearranjo gênico de imunoglobulina	Pontuação final
1	6	2	2	10
2	3	2	2	7
3	3	0	2	5
4	5	2	2	9
5	0	0	1	1
6	6	2	2	10
7	11	2	2	15
8	0	2	1	3
9	6	2	2	10
10	2	1	2	5
11	10	2	2	14
12	NA	2	2	NA
13	6	2	0	8
14	10	2	2	14
15	8	2	2	12
16	8	2	2	12
17	1	1	0	2
18	0	2	2	4
19	5	2	1	8
20	3	1	2	6
21	3	2	2	7
22	3	1	2	6
23	1	1	1	3
24	5	1	2	8
25	3	1	2	6
26	4	0	0	4
27	2	2	2	6
28	3	2	2	7
29	0	2	2	4
30	3	2	2	7
31	6	0	2	8
32	0	0	NA	NA
33	5	1	2	8
34	8	2	2	12
35	3	2	2	7

CE: critério clínico-evolutivo, HP: Histopatológico, IHQ: imuno-histoquímico, NA: não avaliável, NR: não realizado.

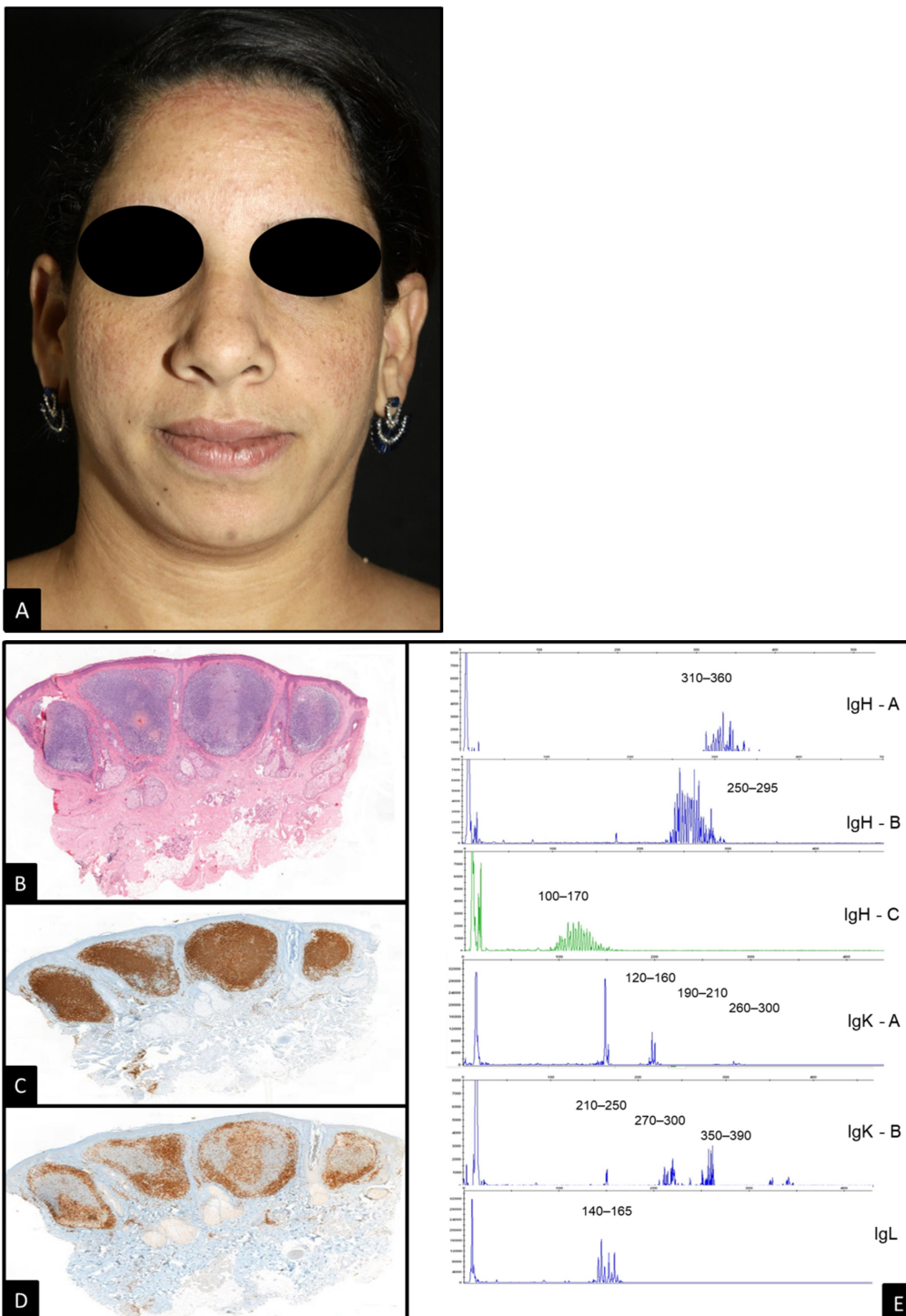
APÊNDICE R - Resultados analíticos da contribuição dos resultados da pesquisa do rearranjo gênico da imunoglobulina em relação aos resultados da associação dos critérios clínico-evolutivos e histopatológicos associado a imuno-histoquímicos dos 35 pacientes avaliados na conclusão final do protocolo de investigação diagnóstica

Caso	CE	HP +IHQ	Pesquisa de rearranjo gênico de Ig	Contribuição diagnóstica da pesquisa do rearranjo gênico da imunoglobulina na conclusão diagnóstica final pelo protocolo de investigação diagnóstica
1	6	2	2	corroborou o diagnóstico de linfoma cutâneo
2	3	2	2	corroborou o diagnóstico de linfoma cutâneo
3	3	0	2	favoreceu o diagnóstico de linfoma cutâneo
4	5	2	2	corroborou o diagnóstico de linfoma cutâneo
5	0	0	1	discordou do diagnóstico de linfoma cutâneo entre os critérios
6	6	2	2	corroborou o diagnóstico de linfoma cutâneo
7	11	2	2	corroborou o diagnóstico de linfoma cutâneo
8	0	2	1	discordou do diagnóstico de linfoma cutâneo entre os critérios
9	6	2	2	corroborou o diagnóstico de linfoma cutâneo
10	2	1	2	possibilitou o diagnóstico de linfoma cutâneo
11	10	2	2	corroborou o diagnóstico de linfoma cutâneo
12	NA	2	2	favoreceu o diagnóstico de linfoma cutâneo
13	6	2	0	discordou do diagnóstico de linfoma cutâneo entre os critérios
14	10	2	2	corroborou o diagnóstico de linfoma cutâneo
15	8	2	2	corroborou o diagnóstico de linfoma cutâneo
16	8	2	2	corroborou o diagnóstico de linfoma cutâneo
17	1	1	0	discordou do diagnóstico de linfoma cutâneo entre os critérios
18	0	2	2	favoreceu o diagnóstico de linfoma cutâneo
19	5	2	1	discordou do diagnóstico de linfoma cutâneo entre os critérios
20	3	1	2	favoreceu o diagnóstico de linfoma cutâneo
21	3	2	2	corroborou o diagnóstico de linfoma cutâneo
22	3	1	2	favoreceu o diagnóstico de linfoma cutâneo
23	1	1	1	não determinou o diagnóstico final
24	5	1	2	favoreceu o diagnóstico de linfoma cutâneo
25	3	1	2	favoreceu o diagnóstico de linfoma cutâneo
26	4	0	0	discordou do diagnóstico de linfoma cutâneo entre os critérios
27	2	2	2	favoreceu o diagnóstico de linfoma cutâneo
28	3	2	2	corroborou o diagnóstico de linfoma cutâneo
29	0	2	2	favoreceu o diagnóstico de linfoma cutâneo
30	3	2	2	corroborou o diagnóstico de linfoma cutâneo
31	6	0	2	favoreceu o diagnóstico de linfoma cutâneo
32	0	0	NA	NA
33	5	1	2	favoreceu o diagnóstico de linfoma cutâneo
34	8	2	2	corroborou o diagnóstico de linfoma cutâneo
35	3	2	2	corroborou o diagnóstico de linfoma cutâneo

CE:clínico-evolutivo, HP+IHQ: histopatológico associado a imunohistoquímico, NA: não avaliável.

APÊNDICE S - Resultados dos critérios do protocolo de investigação diagnóstica

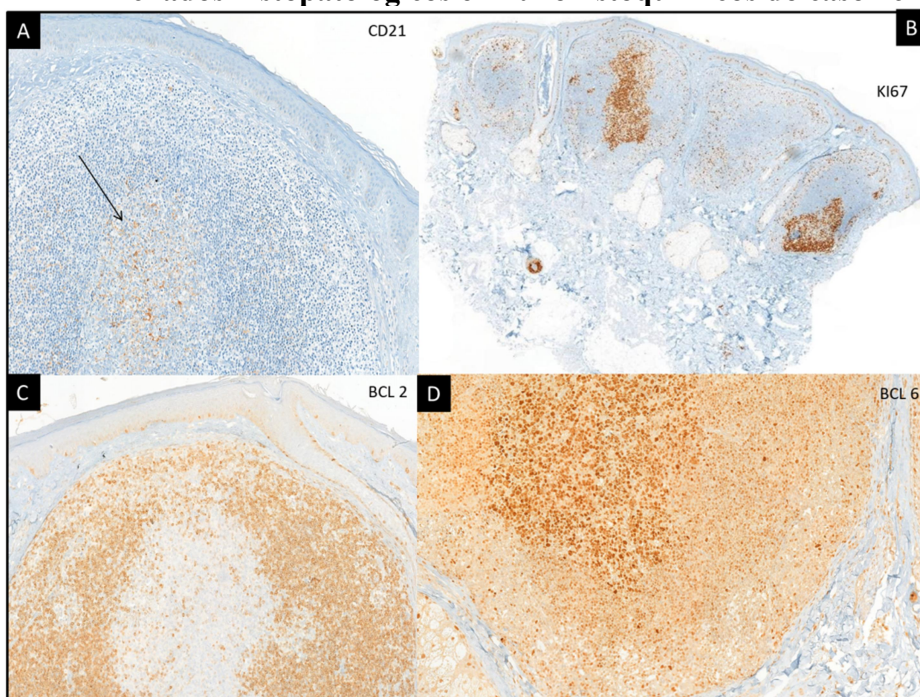
- Achados do protocolo de investigação diagnóstica referente ao caso 26



A, paciente do sexo feminino com múltiplas pápulas monomórficas localizadas na face e tronco superior em padrão simétrico (caso 26). B, infiltrado linfocítico intradérmico bem delimitado com crescimento nodular e expansivo (H&E, X 20). C, células com imunomarcagem de CD20 (X 20). D,

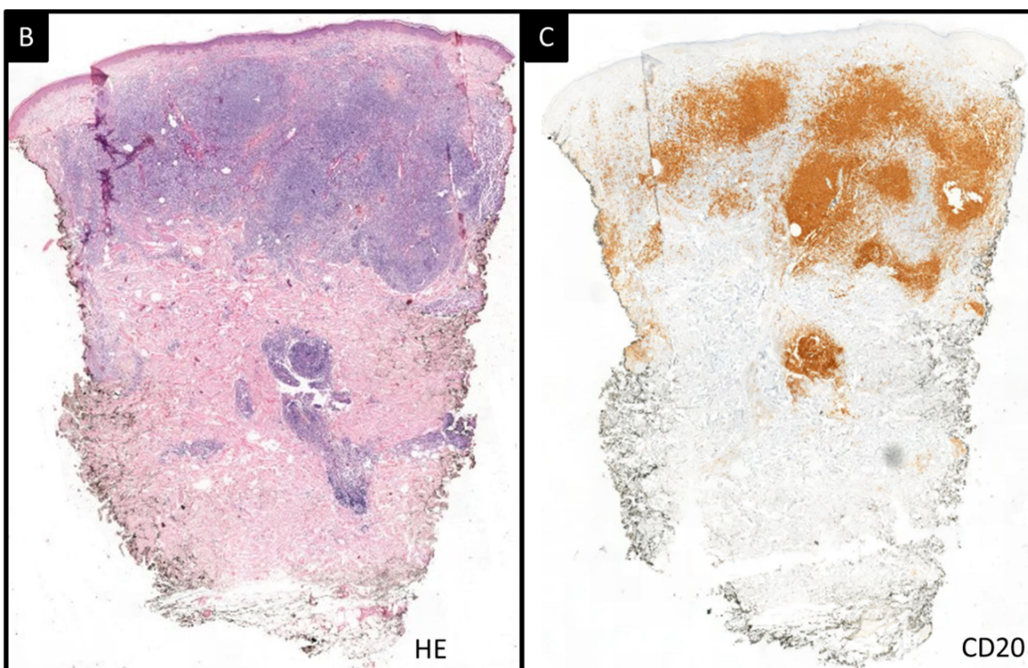
células com imunomarcção de CD3 (X 20). E, resultado policlonal de biologia molecular pela pesquisa do rearranjo gênico da imunoglobulina.

- **Achados histopatológicos e imunohistoquímicos do caso 26**



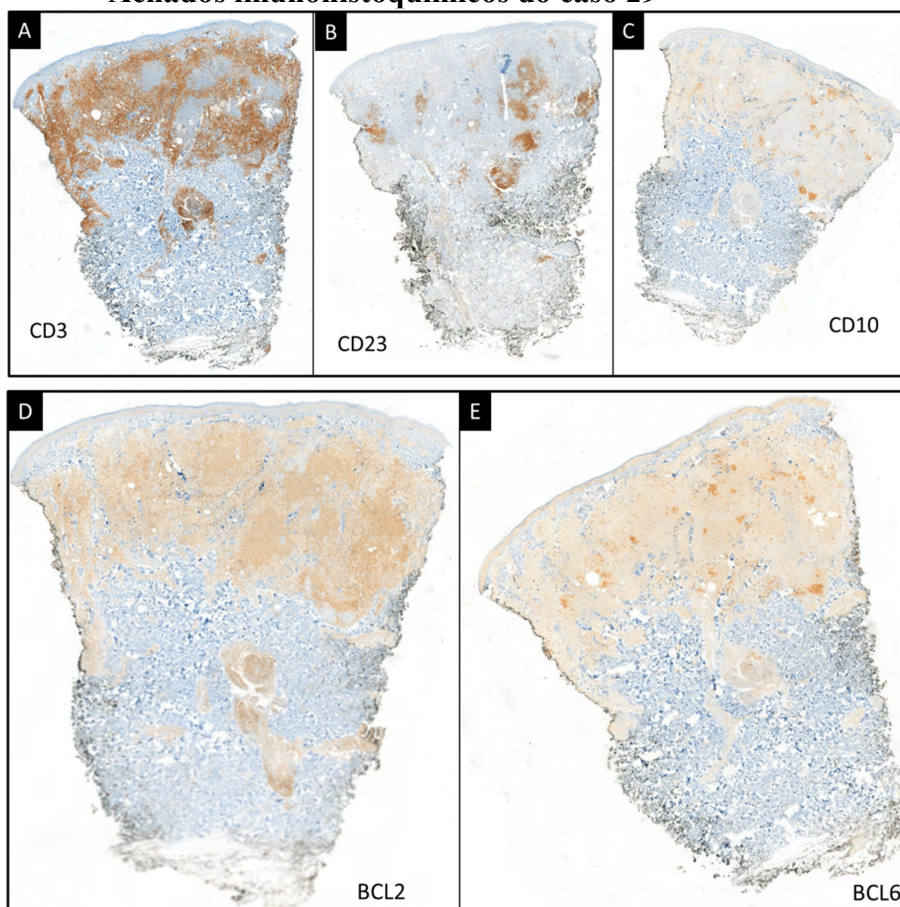
A, redes de células foliculares dendríticas residuais em marcação de CD21 (seta preta, X100). B, imunomarcção de KI 67 com alto índice proliferativo em centros germinativos (X 20). C, ausência de imunomarcção de BCL2 em centros germinativos (X 100). D, imunomarcção de BCL6 em centros germinativos (X 100).

- Achados do protocolo de investigação diagnóstica referente ao caso 29



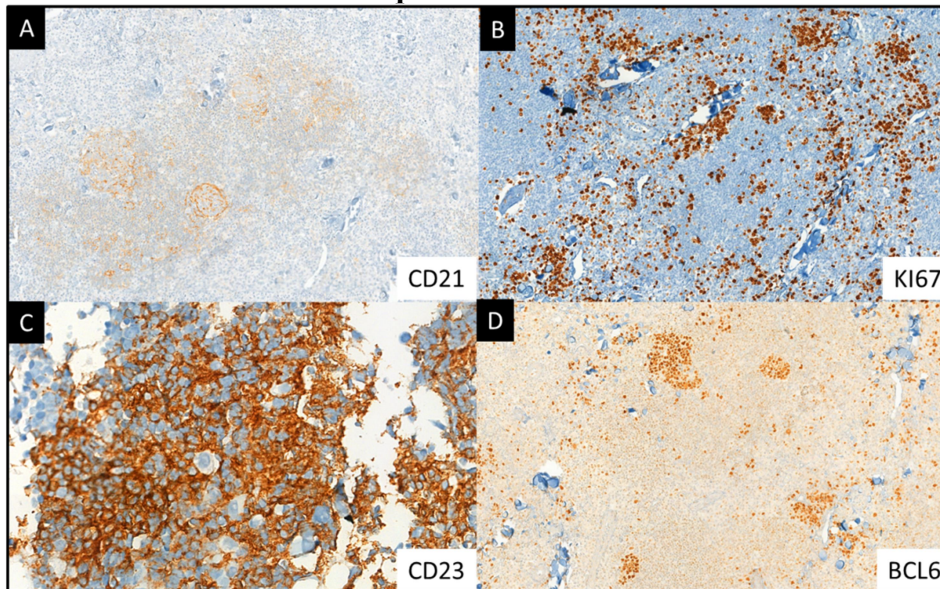
A, paciente do sexo feminino com placa eritematosa em braço esquerdo. B, infiltrado linfocítico moderado com padrão de distribuição difuso com áreas nodulares e intersticiais com dissecção de colágeno (H&E, X 20). C, células com imunomarcagem de CD20 com esboço nodular (X 20).

- **Achados imunohistoquímicos do caso 29**



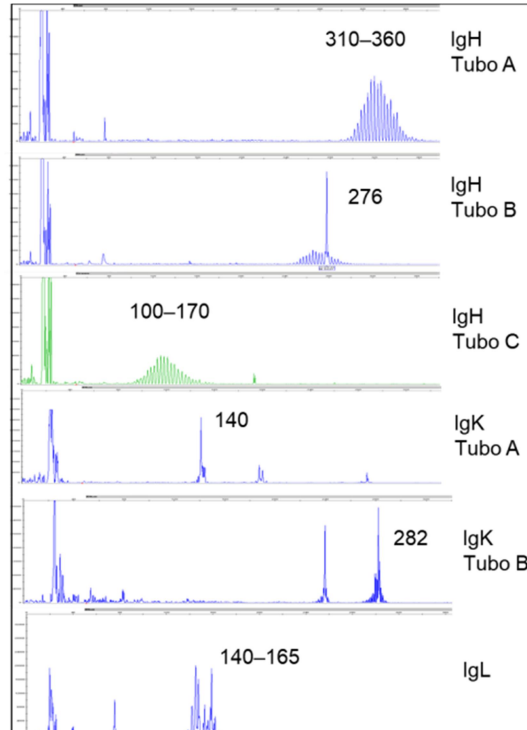
A, células com imunomarcção de CD3 em regiões interfoliculares, X 20. B, imunomarcção de CD23, X 20. C, imunomarcção de CD10, X 20. D, ausência de imunomarcção de BCL2 em centros germinativos (esquerda). E, imunomarcção importante de BCL6 em centros germinativos, X 20.

- **Achados imunohistoquímicos do caso 29**



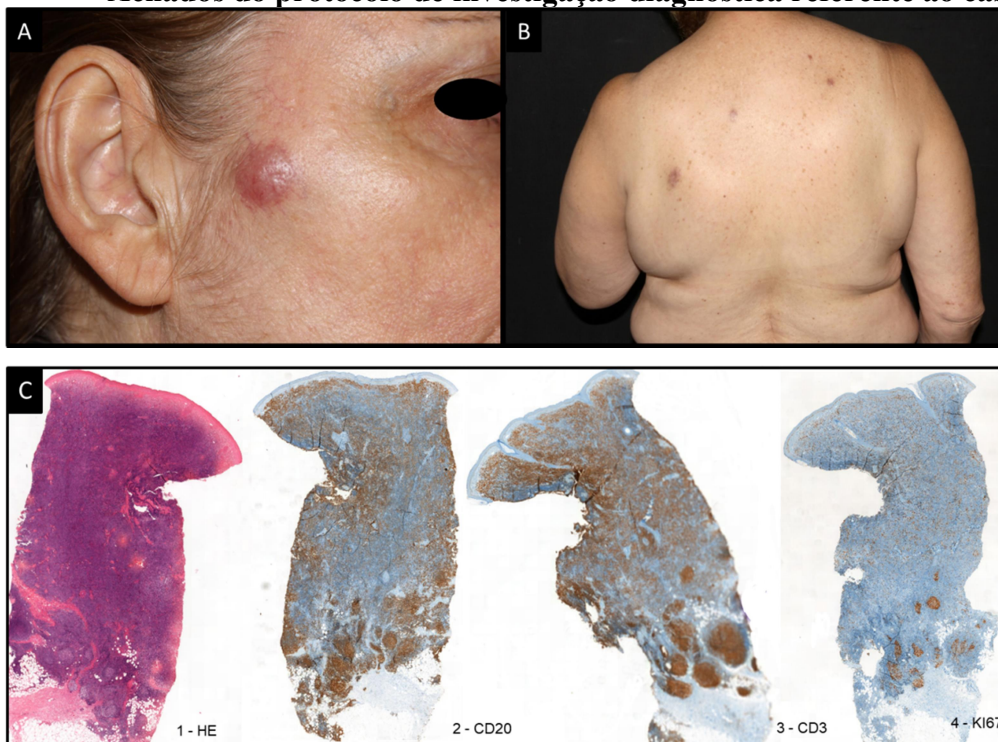
A, redes de células foliculares dendríticas residuais com imunomarcacão de CD21 (X 100). B, imunomarcacão de KI 67 com marcacão de 26 a 50% em células de interesse (X 100). C, imunomarcacão de CD23 principalmente em células dendríticas de centros germinativos (X 400). D, imunomarcacão de BCL6 em centros germinativos (X 100).

- **Achados de biologia molecular pela pesquisa do rearranjo gênico da imunoglobulina do caso 29**



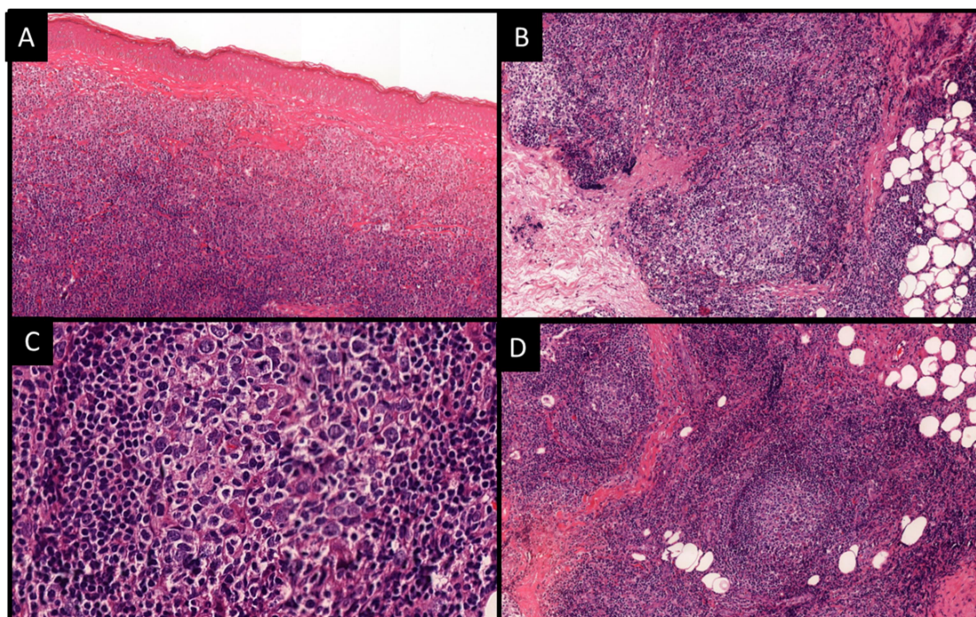
Pesquisa de rearranjo gênico de imunoglobulina por PCR realizada em amostra de pele congelada proveniente de biópsia cutânea do caso 29. Resultado monoclonal de cadeia pesada e leve (kappa)

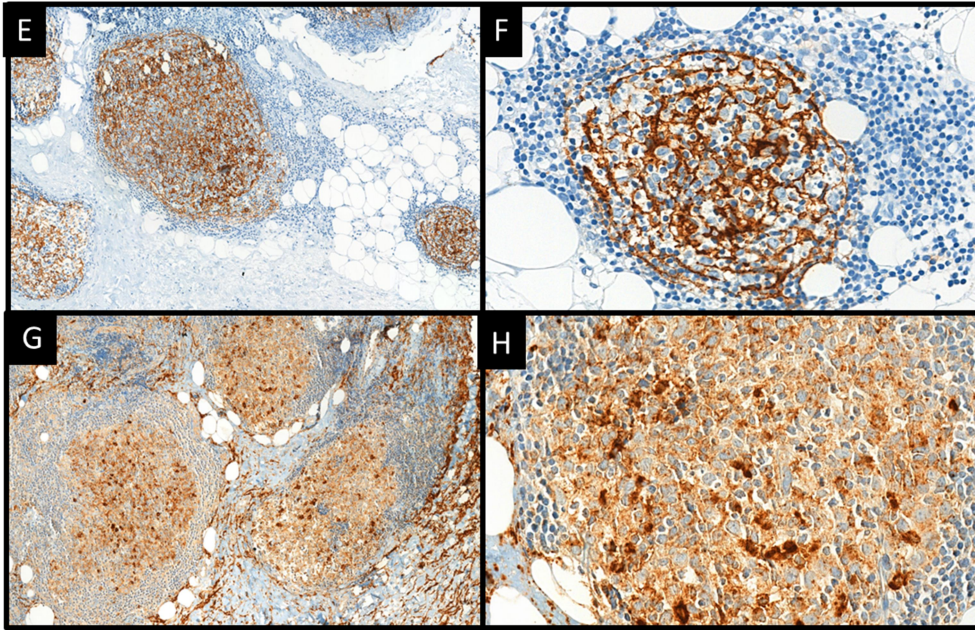
- **Achados do protocolo de investigação diagnóstica referente ao caso 30**



A, paciente do sexo feminino com nódulo eritematoso em face. B, placas eritematosas em dorso superior. C, 1, infiltrado linfocítico denso com padrão difuso e nodular (H&E, X 20), C- 2, células com imunomarcção de CD20 principalmente em células grandes (X 20). C- 3, células com imunomarcção de CD3 principalmente de células pequenas com esboço nodular (X 20). C- 4, células com imunomarcção de KI67 de 26 a 50% em células de interesse (X 20).

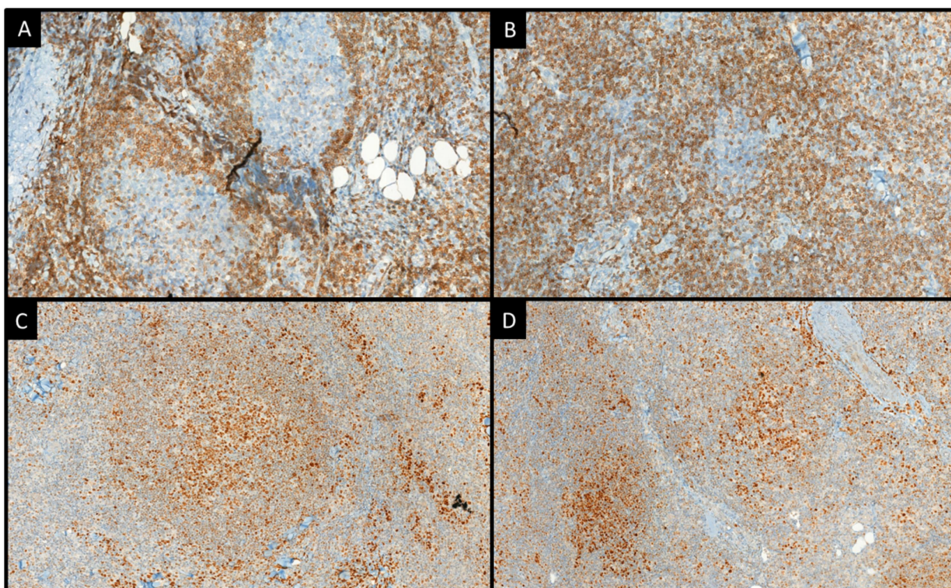
- **Achados histopatológicos e imunohistoquímicos do caso 30**





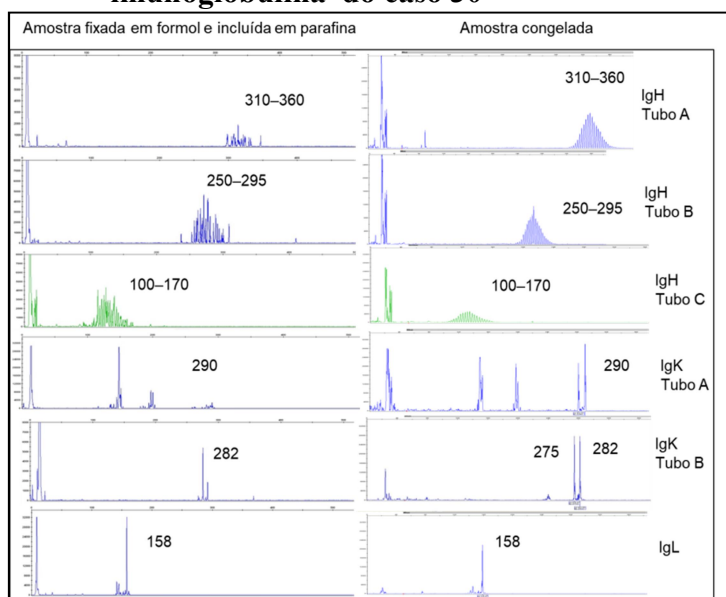
A, presença de zona de Grenz (H&E, X 100). B, infiltrado nodular profundo com dissecção de colágeno, (H&E, X 100). C, infiltrado com células pequenas e grandes atípicas, (H&E, X 400). D, folículos na profundidade que infiltram hipoderme, (H&E, X 100). E, folículos na profundidade que infiltram hipoderme com imunomarcção de CD21, (X 100). F, imunomarcção de CD21 em redes de células foliculares dendríticas (X 400). G, folículos na profundidade com imunomarcção de CD10, (X 100). H, células do centro germinativo com imunomarcção (51 a 75%) de CD10, (X 400).

- **Achados histopatológicos e imunohistoquímicos do caso 30**



A, imunomarcção de BCL2 , (X 100). B, A, ausência de imunomarcção de BCL2 m centros germinativos, (X 100). C - imunomarcção de BCL6 , (X 100). D, imunomarcção de BCL6 de 51 a 75% em centros germinativos (X 100).

- **Achados de biologia molecular pela pesquisa do rearranjo gênico da imunoglobulina do caso 30**



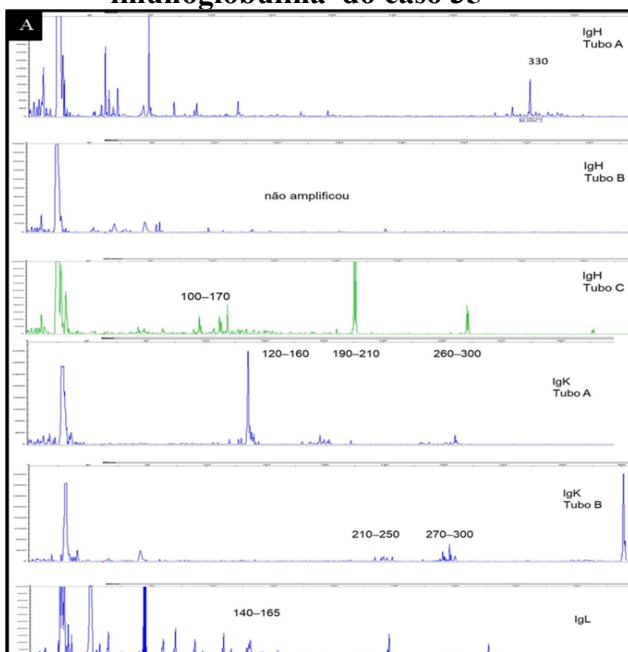
Pesquisa de rearranjo gênico de imunoglobulina por PCR realizada em amostra fixada em formol e incluída em parafina (esquerda) e amostra congelada (direita) provenientes de biópsia cutânea do caso 30. Resultado monoclonal de cadeia leves kappa e lambda.

- Achados do protocolo de investigação diagnóstica referente ao caso 35



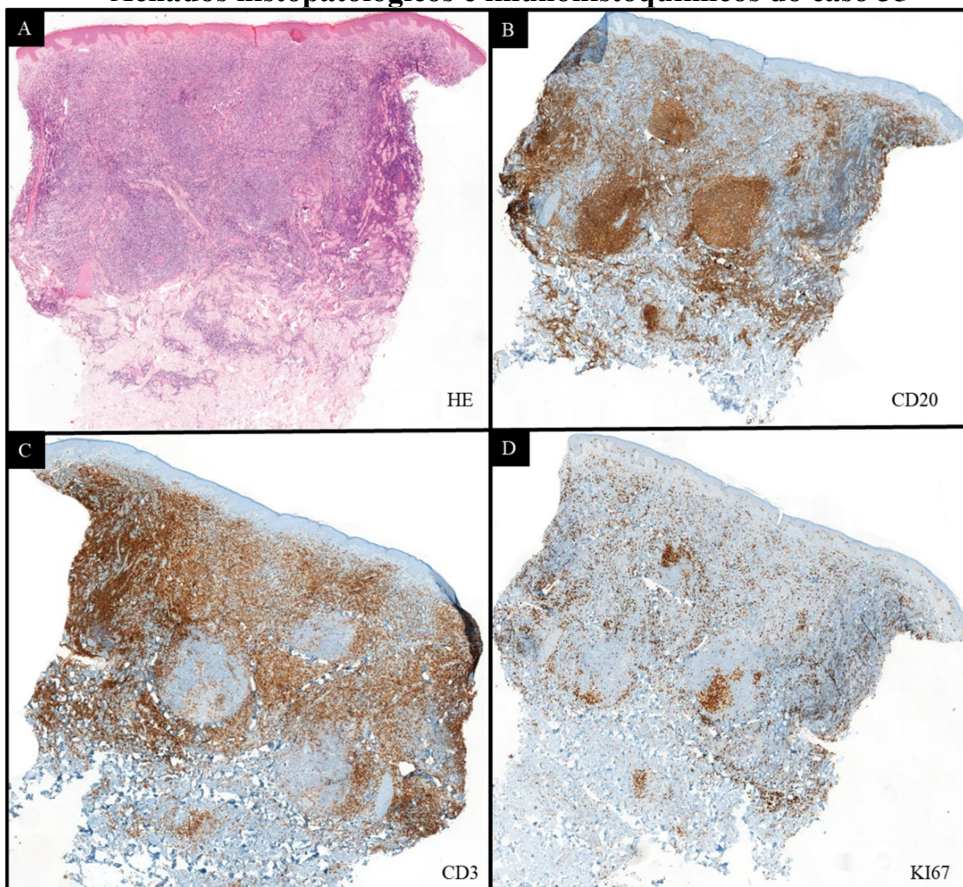
A, paciente do sexo masculino com nódulos e pápulas eritematosas em tronco (setas pretas).

- **Achados de biologia molecular pela pesquisa do rearranjo gênico da imunoglobulina do caso 35**



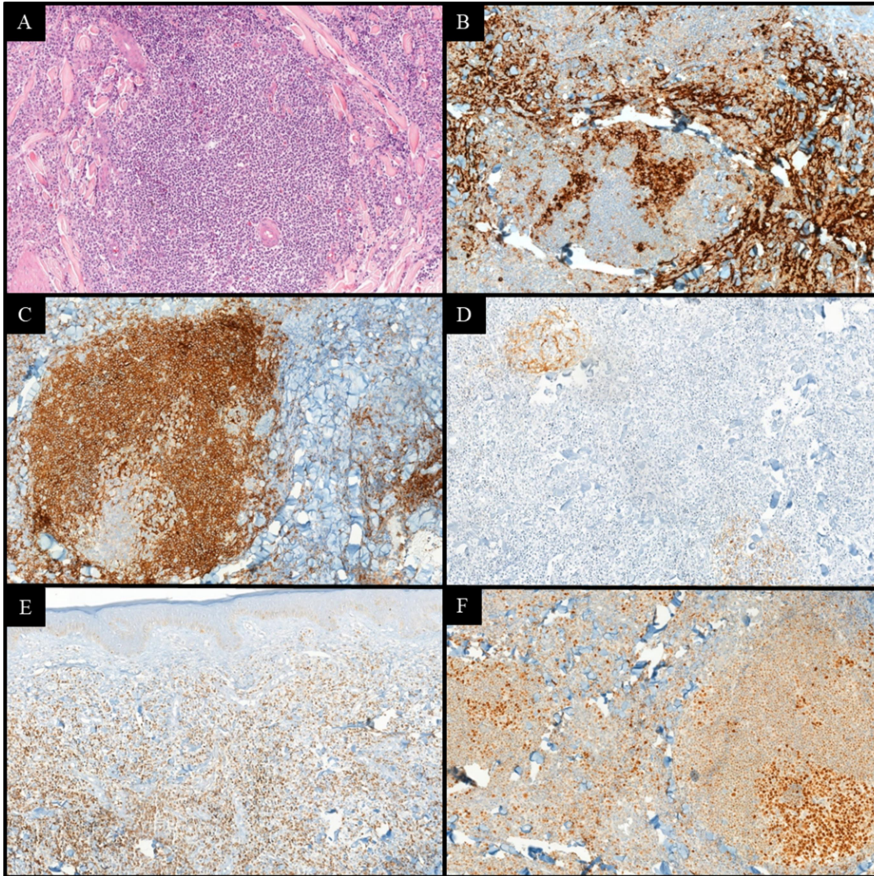
A, resultado monoclonal de cadeia pesada pela pesquisa do rearranjo gênico da imunoglobulina.

- **Achados histopatológicos e imunohistoquímicos do caso 35**



A, infiltrado linfocítico intenso com padrão intersticial e nodular (H&E, X 20). B, imunomarcção de CD20 principalmente em região de folículos (X 20). C, imunomarcção de CD3 em região interfolicular (X 20). D, células com imunomarcção de KI67 em 26 a 50% das células de interesse (X 20).

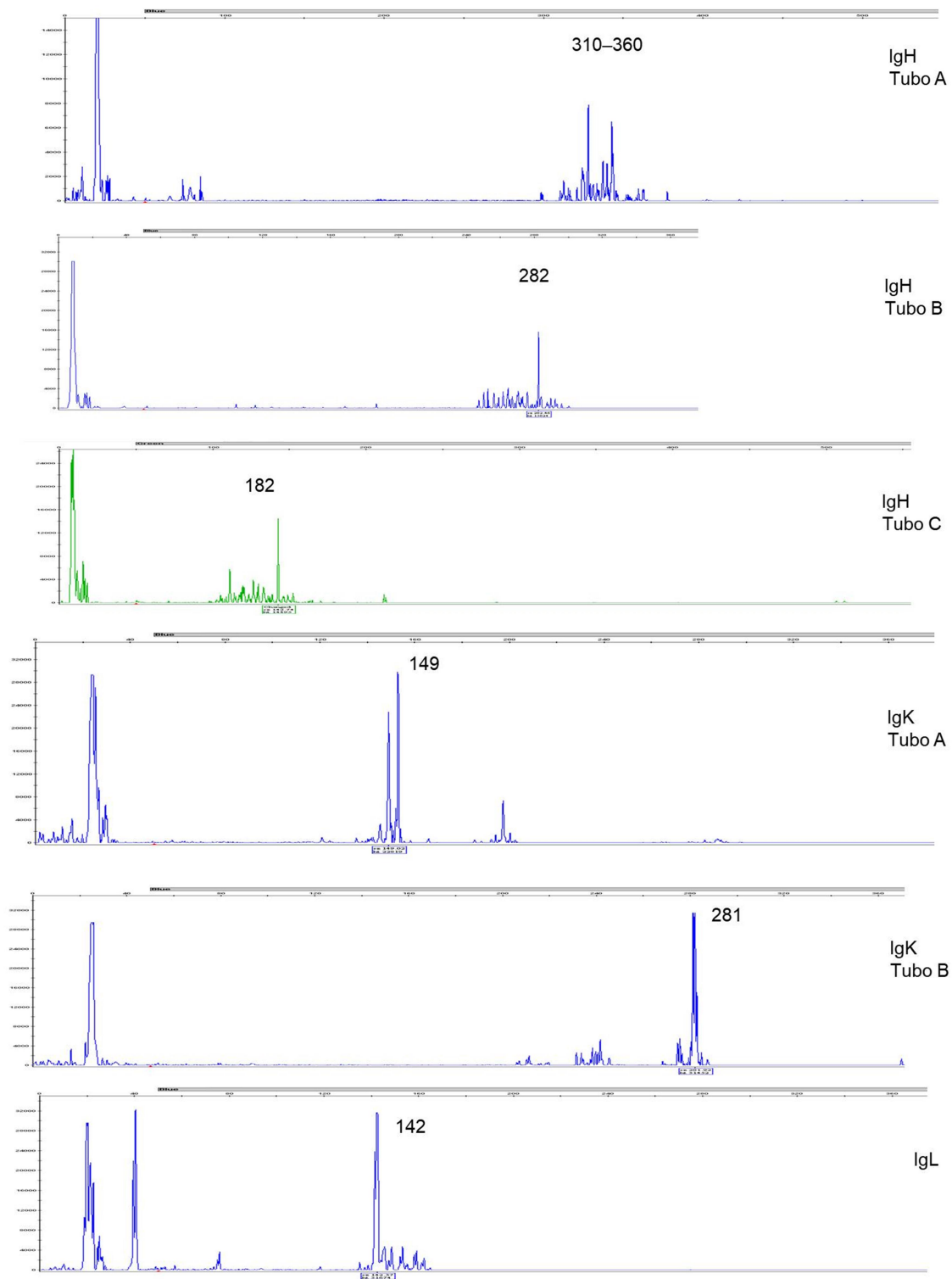
- **Achados histopatológicos e imunohistoquímicos do caso 35**



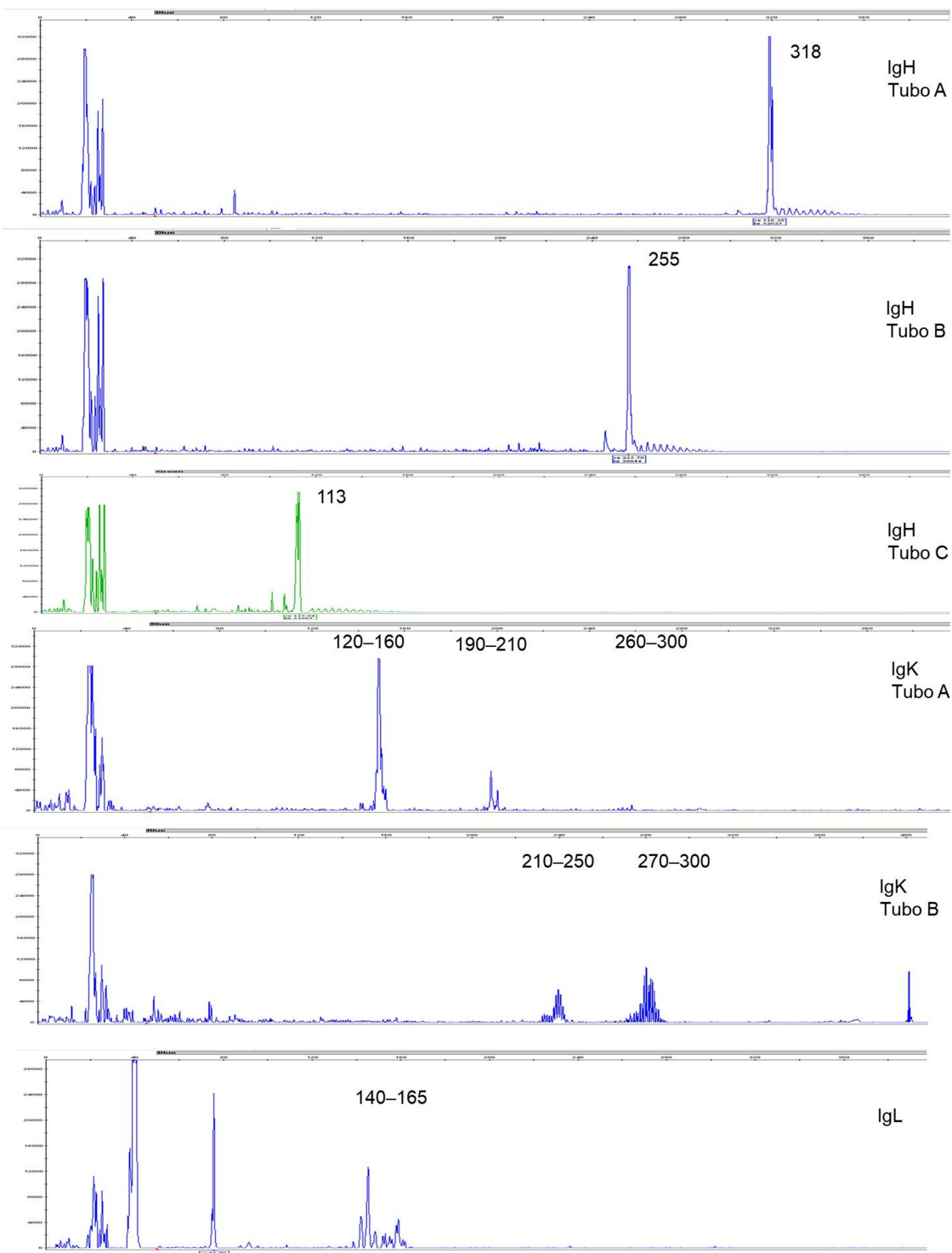
A, infiltrado celular nodular profundo, (H&E, X 100). B, centros germinativos residuais com imunomarcção de CD10, (X 100). C, imunomarcção de CD23 em linfócitos da zona do manto (X 100). D, imunomarcção de CD21 em células foliculares dendríticas, (X 100). E, imunomarcção de BCL2 em centros germinativos (X 100). F, imunomarcção de BCL6 em centros germinativos, (X 100).

APÊNDICE T - Eletroferogramas referentes aos resultados da pesquisa de rearranjo gênico da imunoglobulina

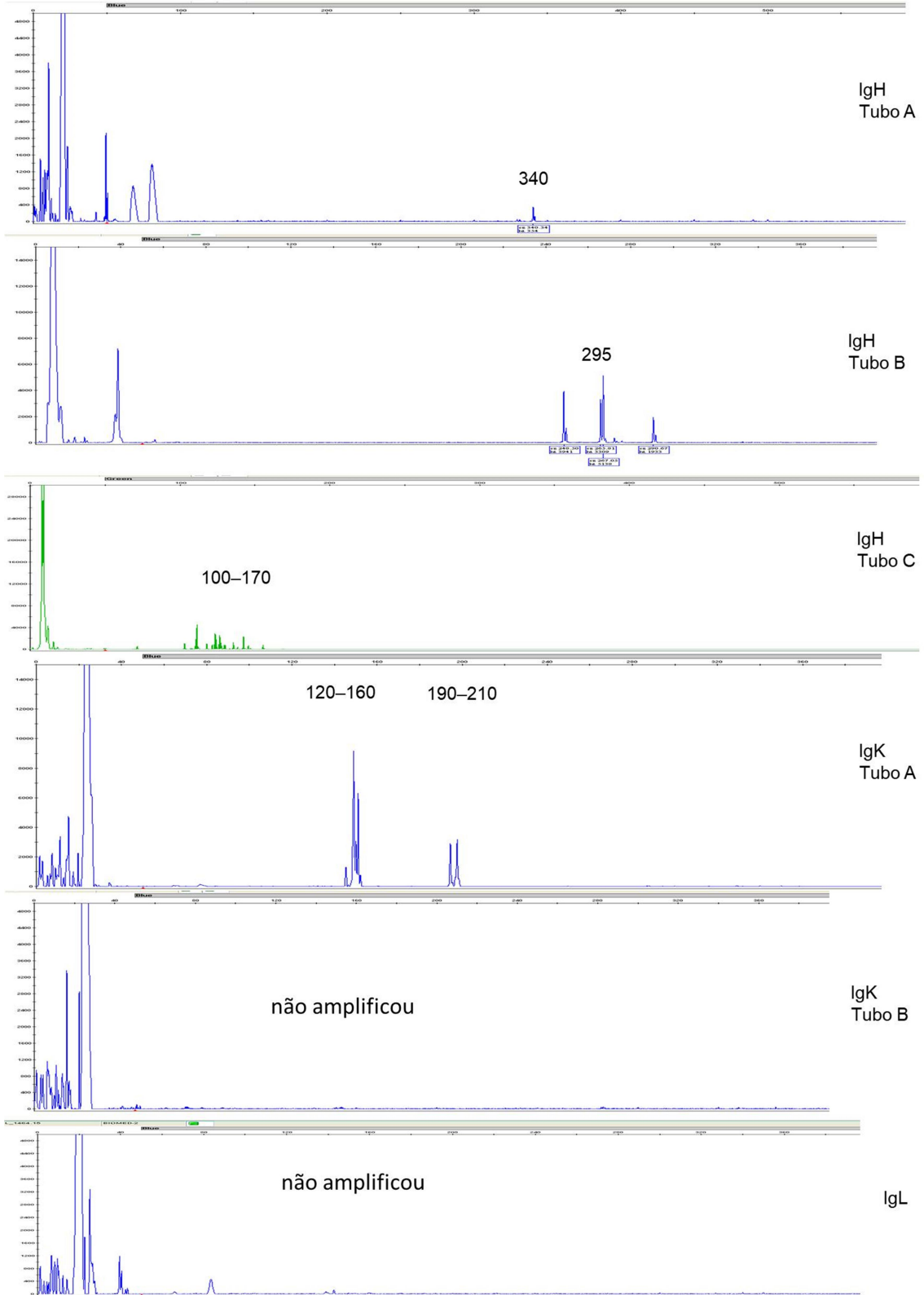
Caso 1



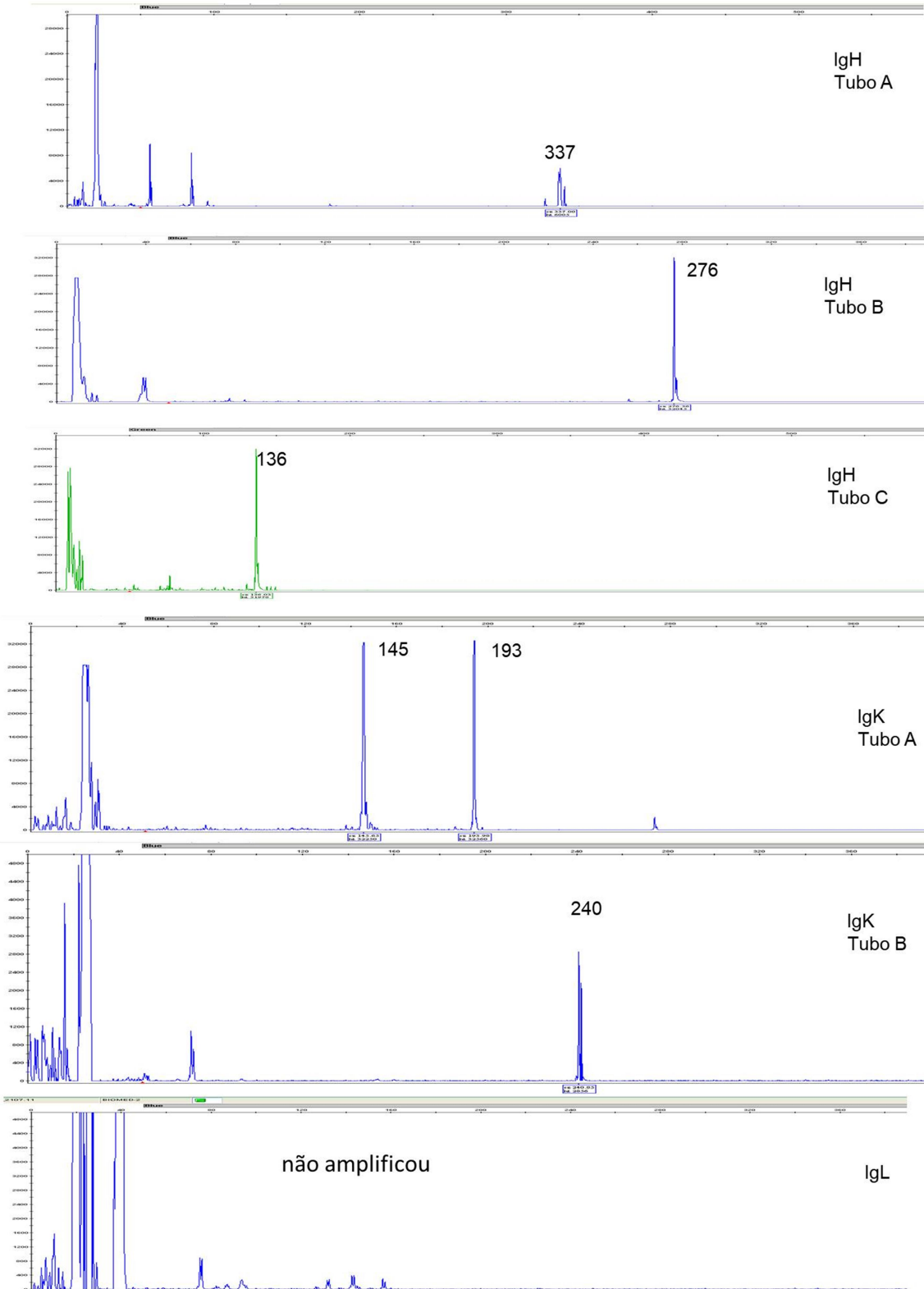
Caso 2



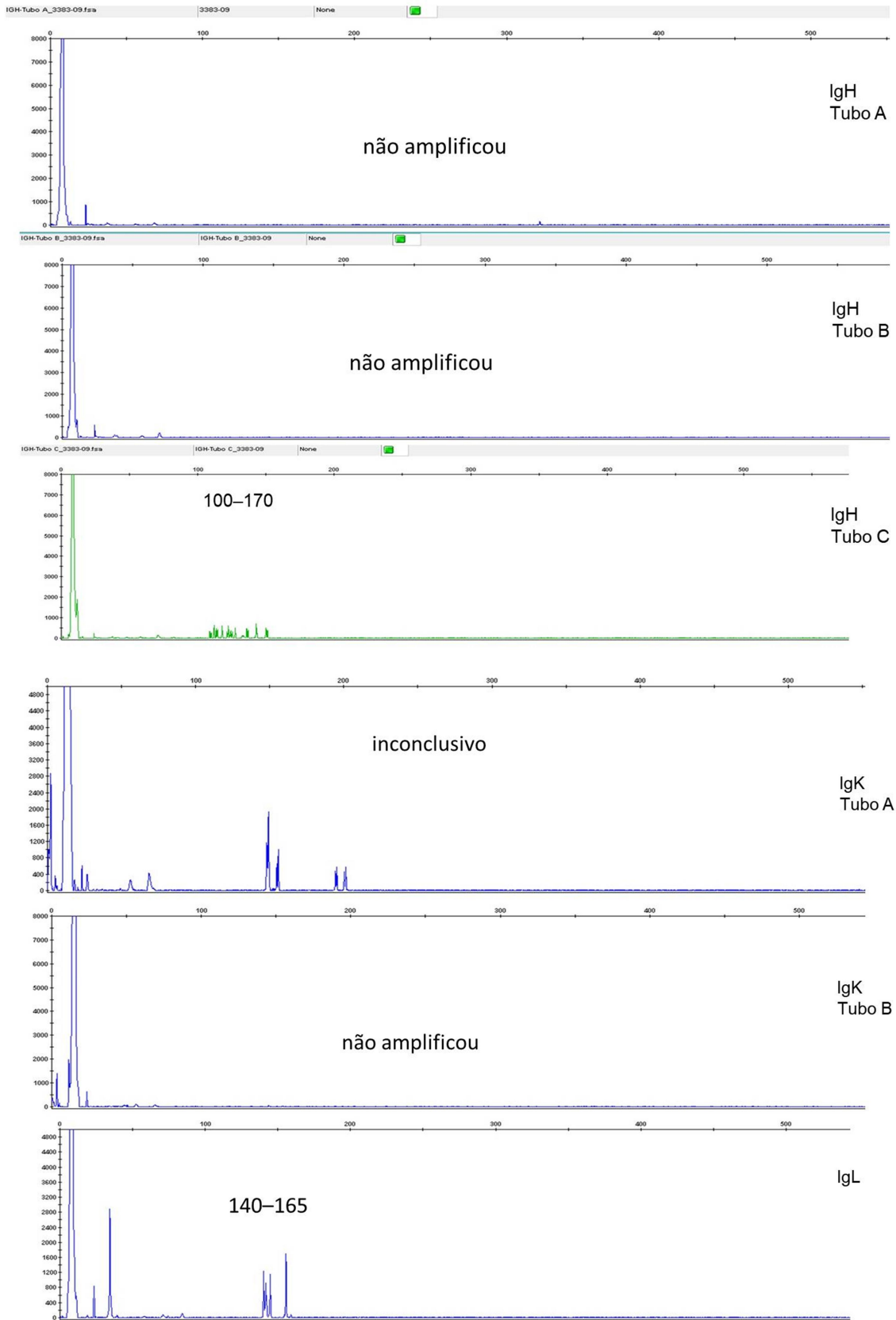
Caso 3



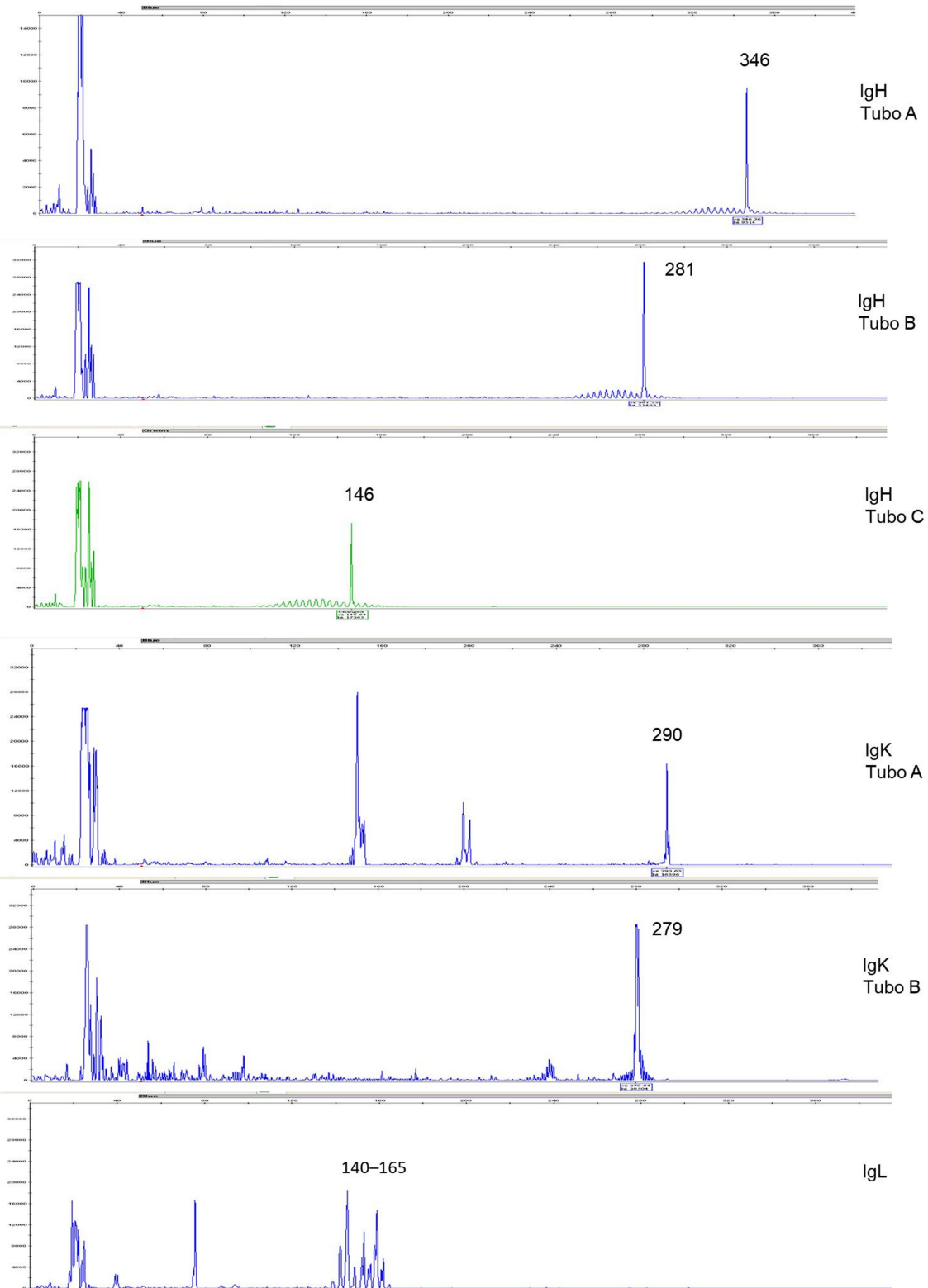
Caso 4



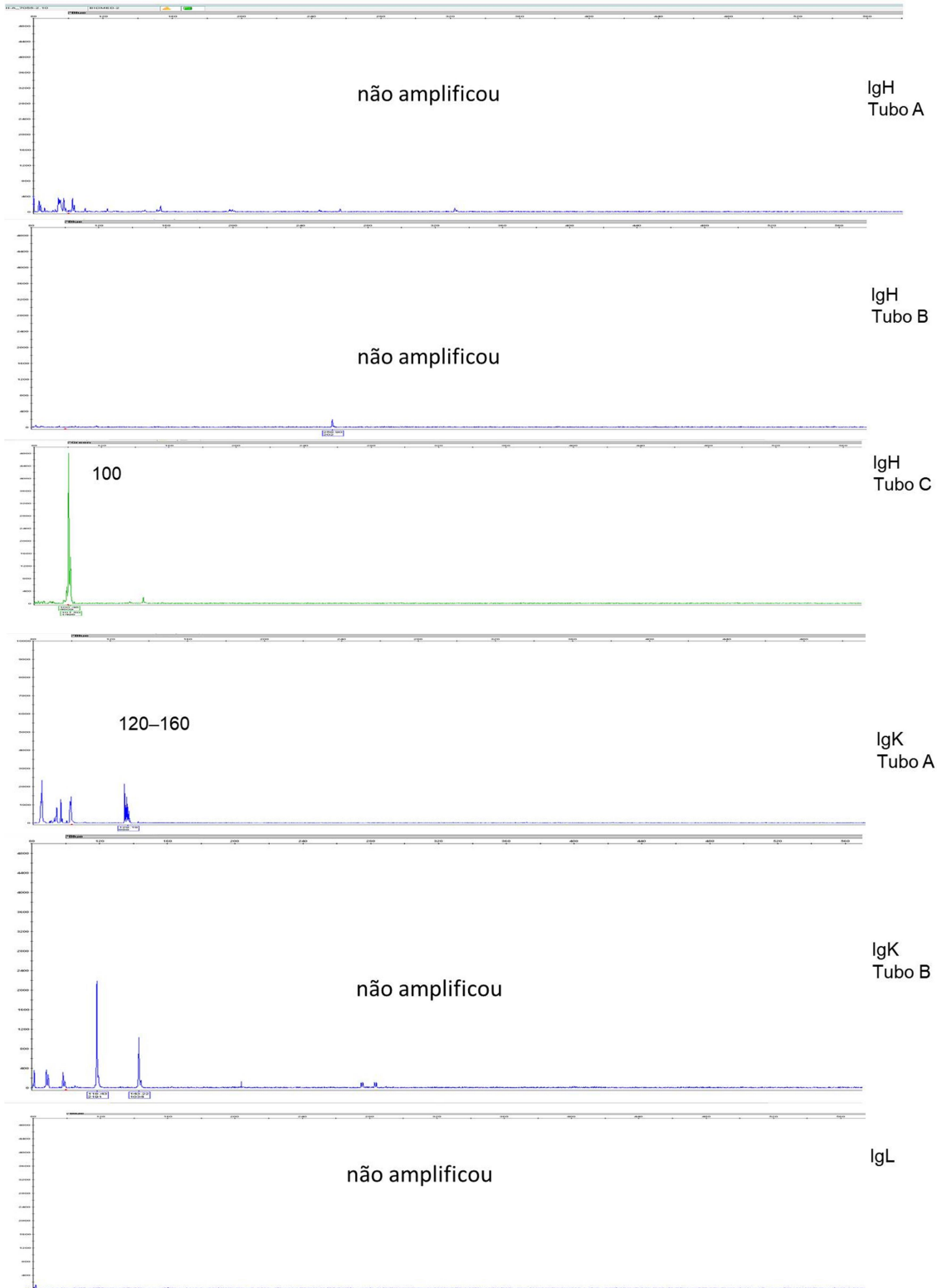
Caso 5



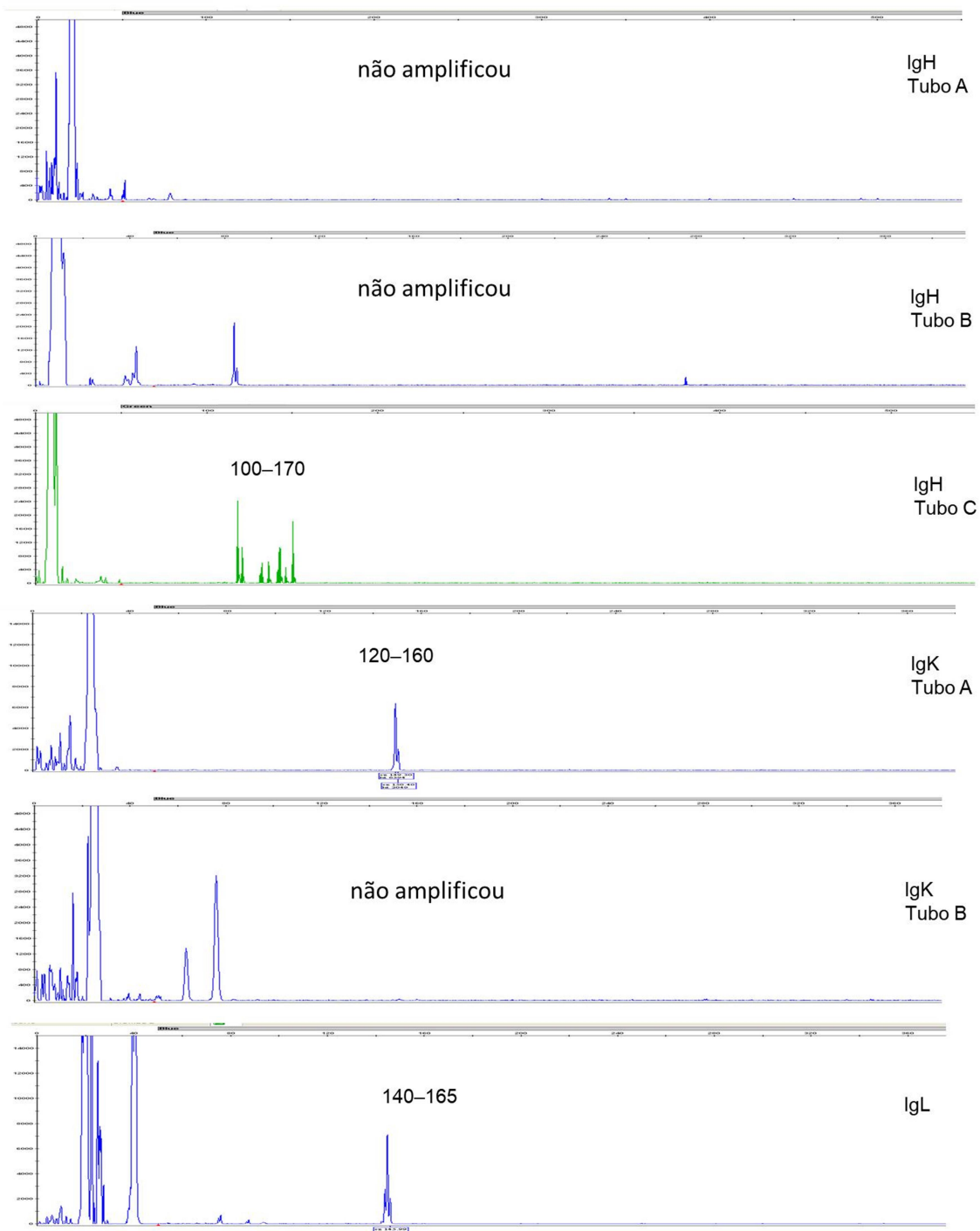
Caso 6



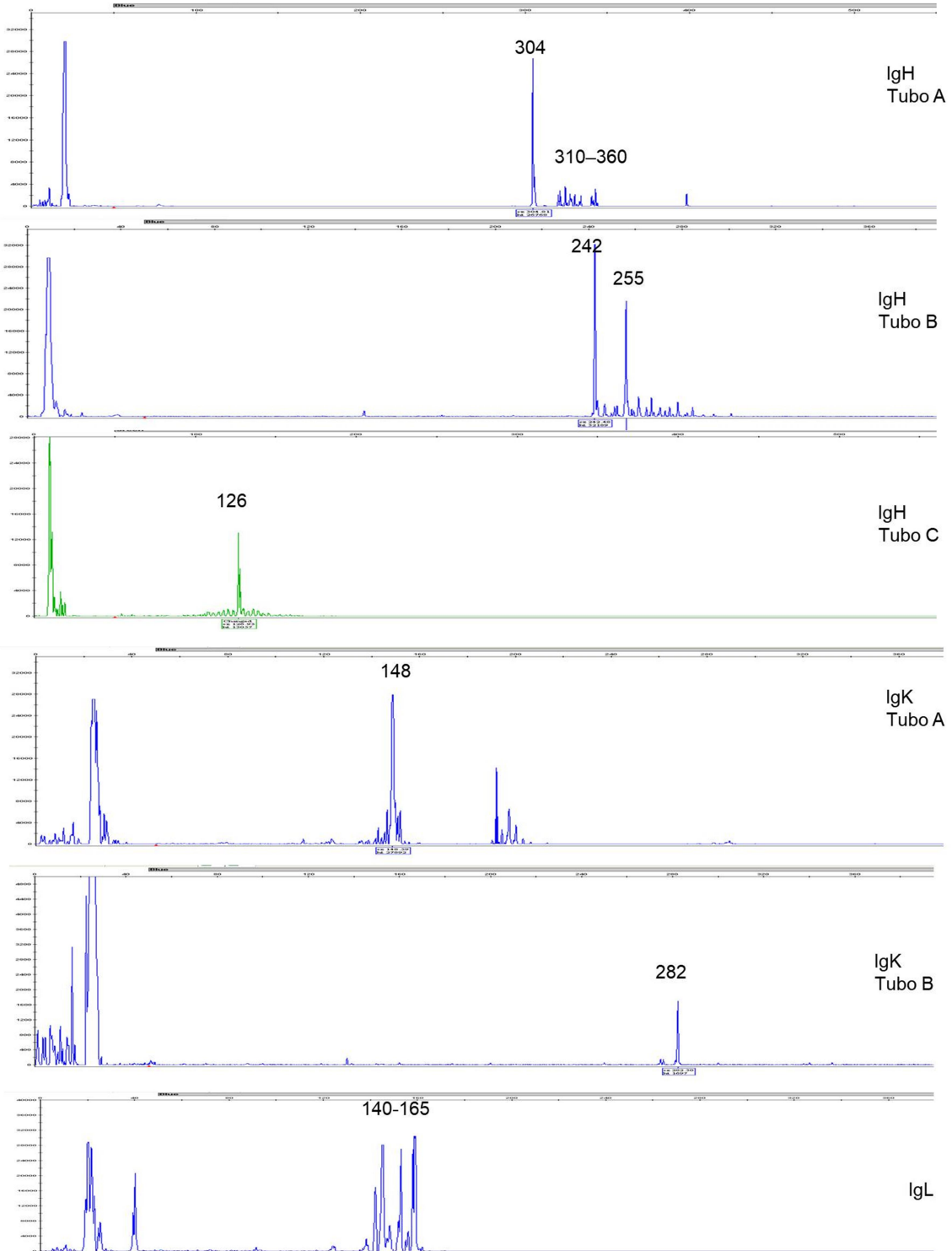
Caso 7



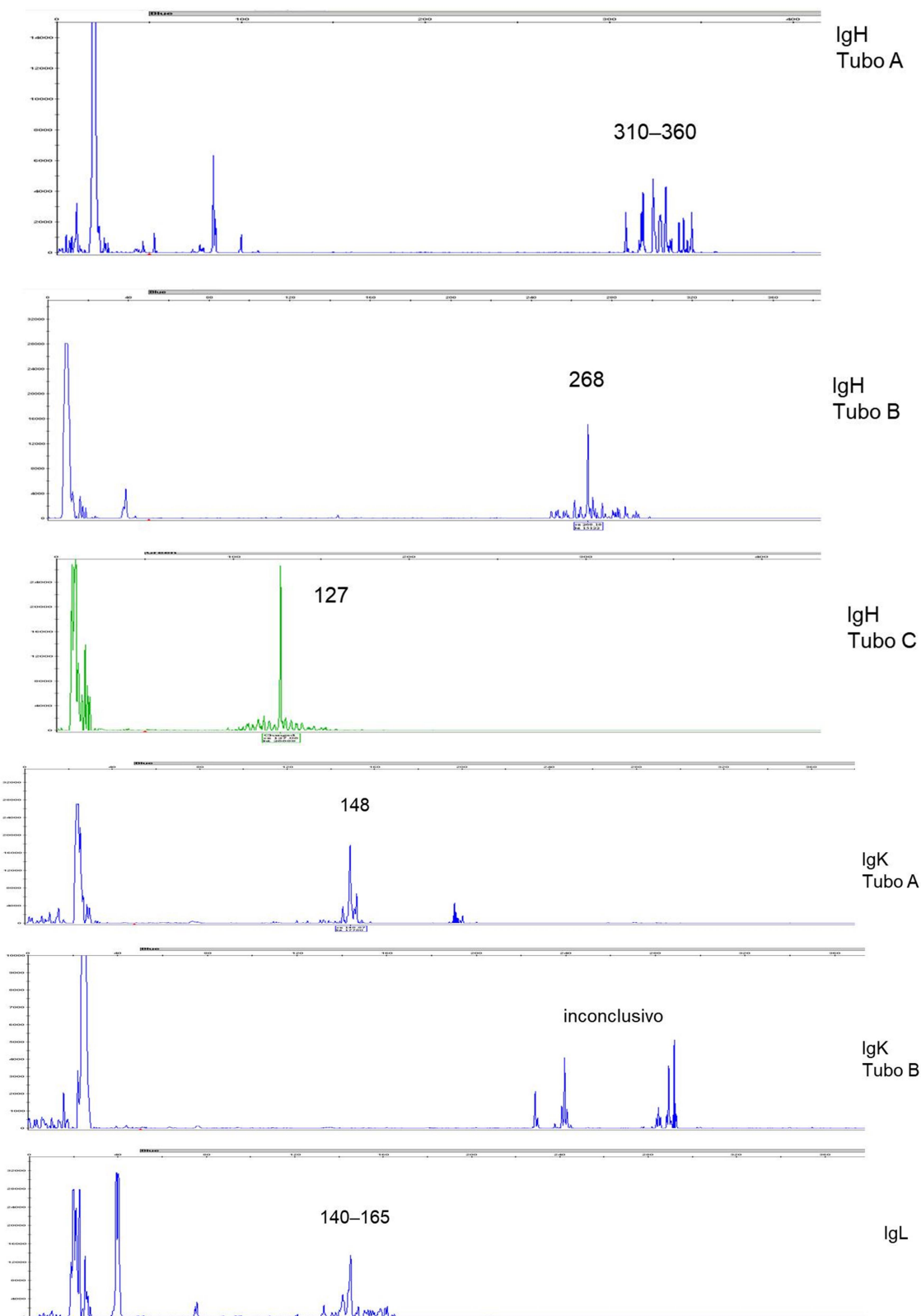
Caso 8



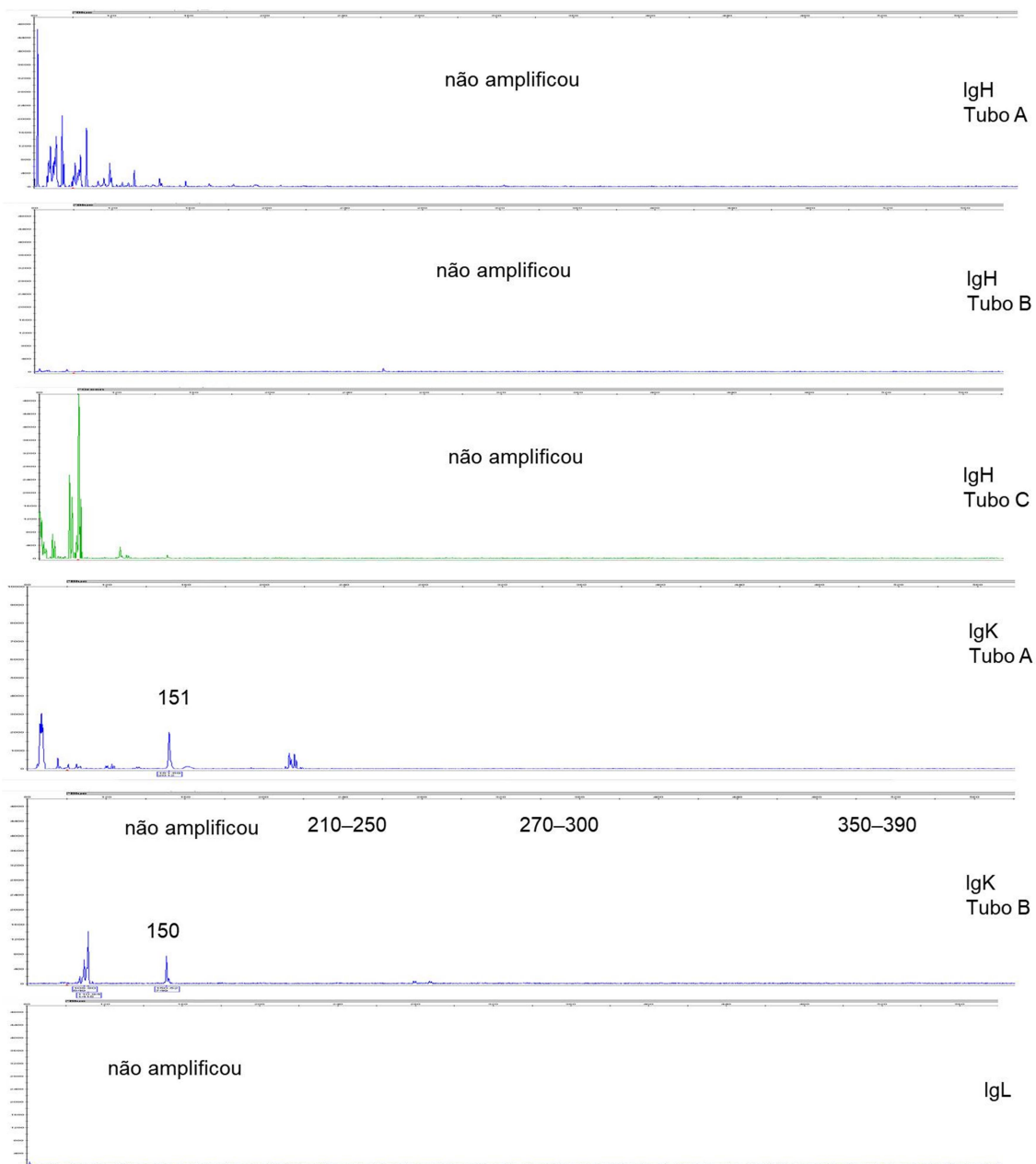
Caso 9



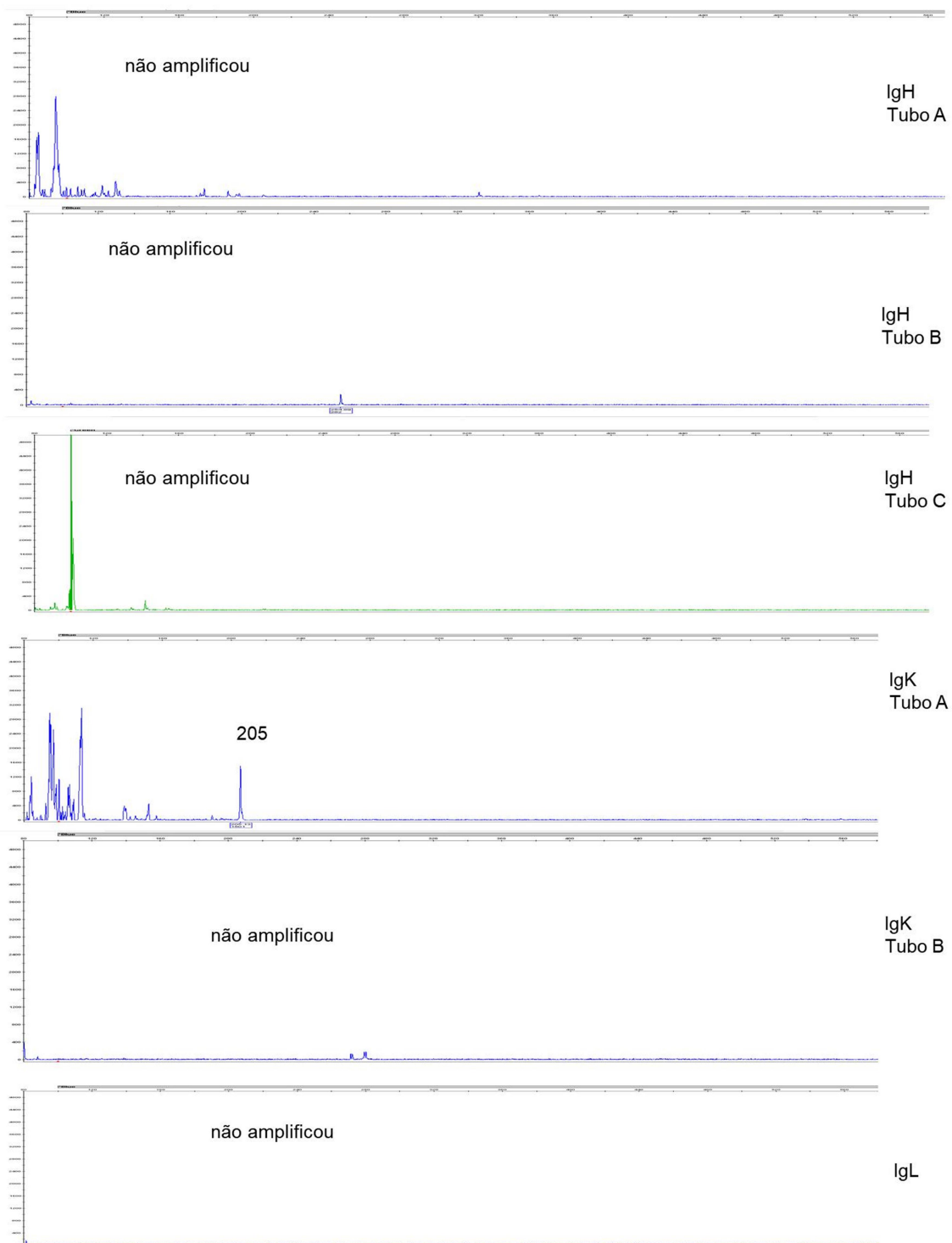
Caso 10



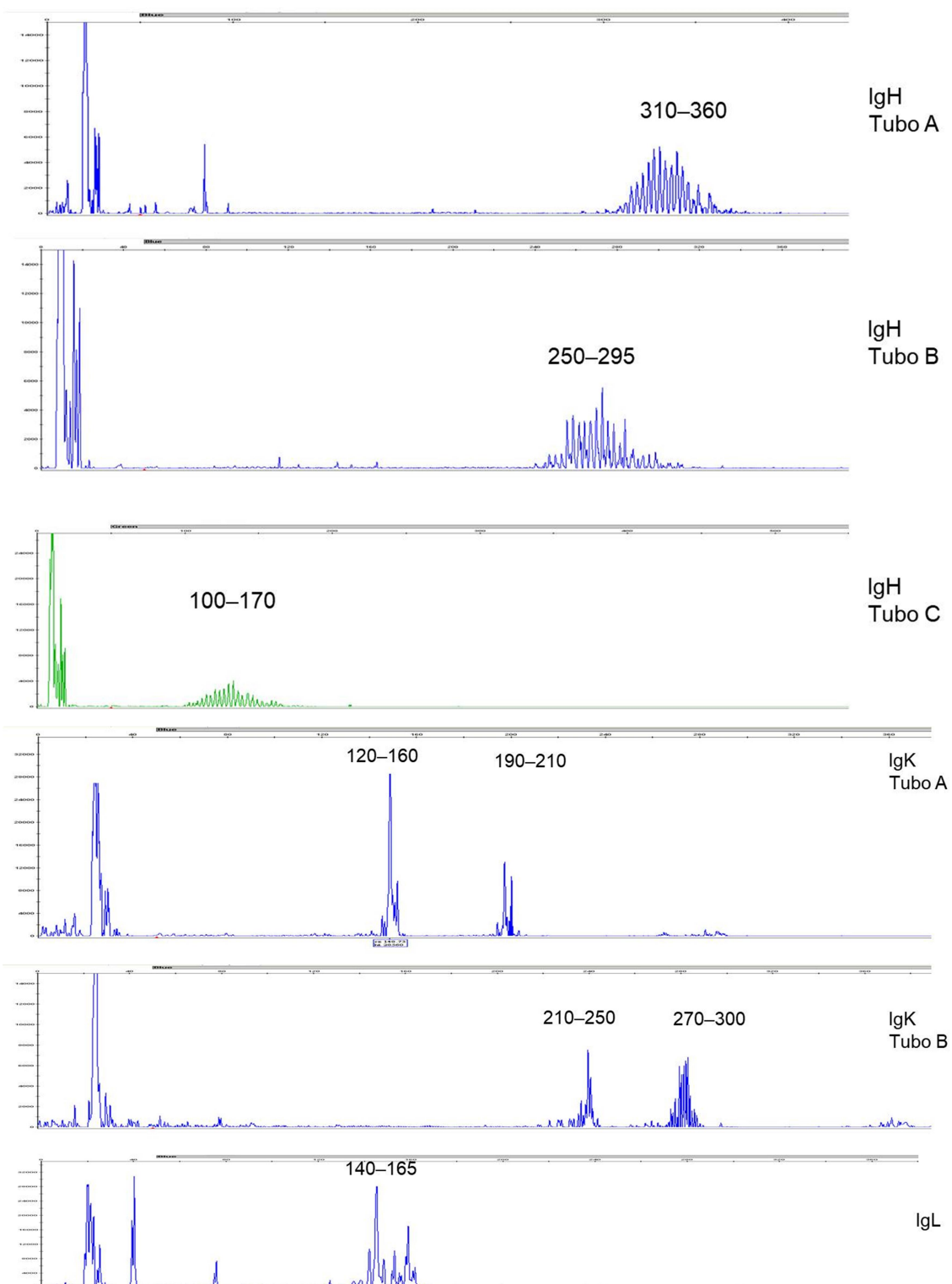
Caso 11



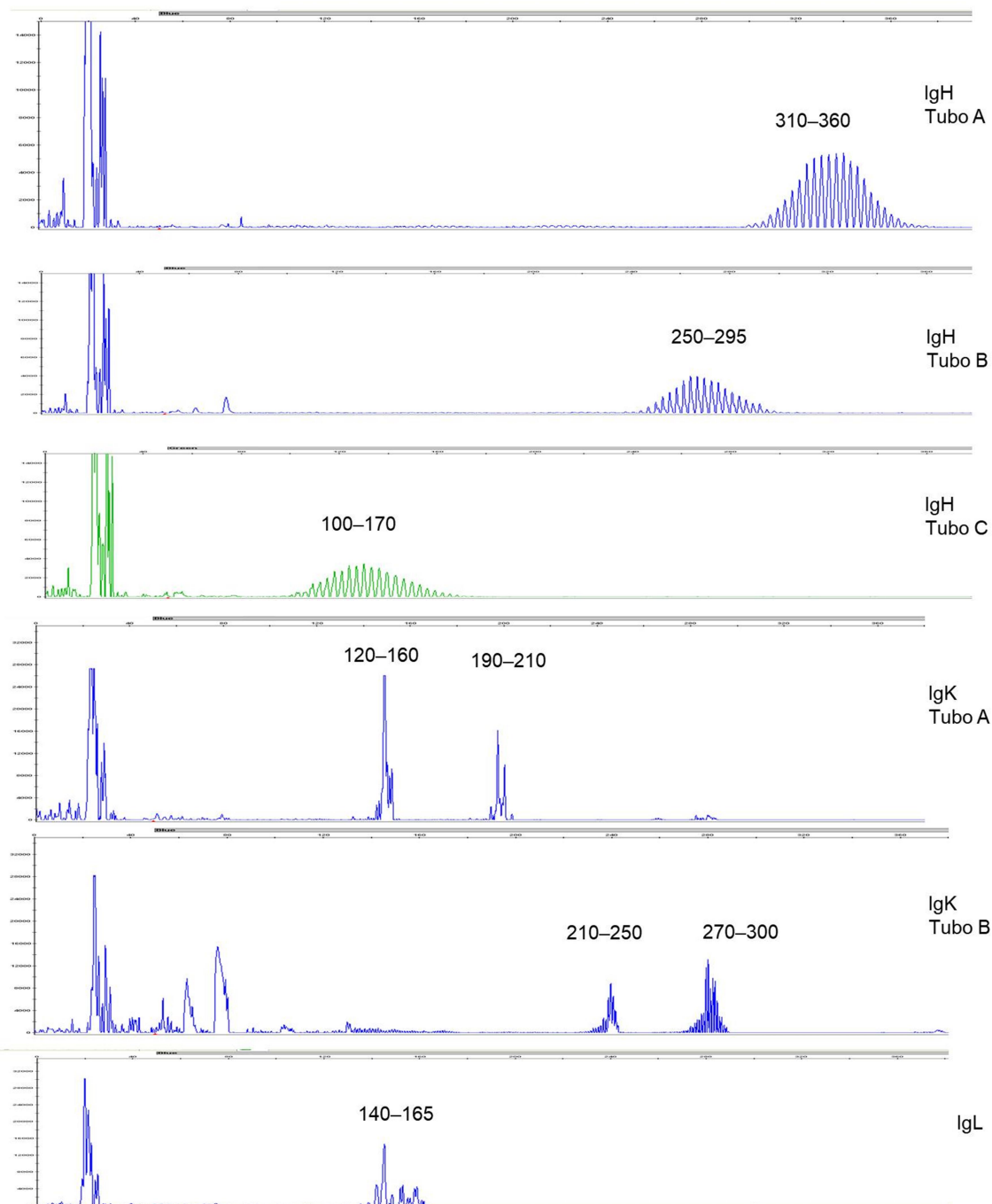
Caso 12



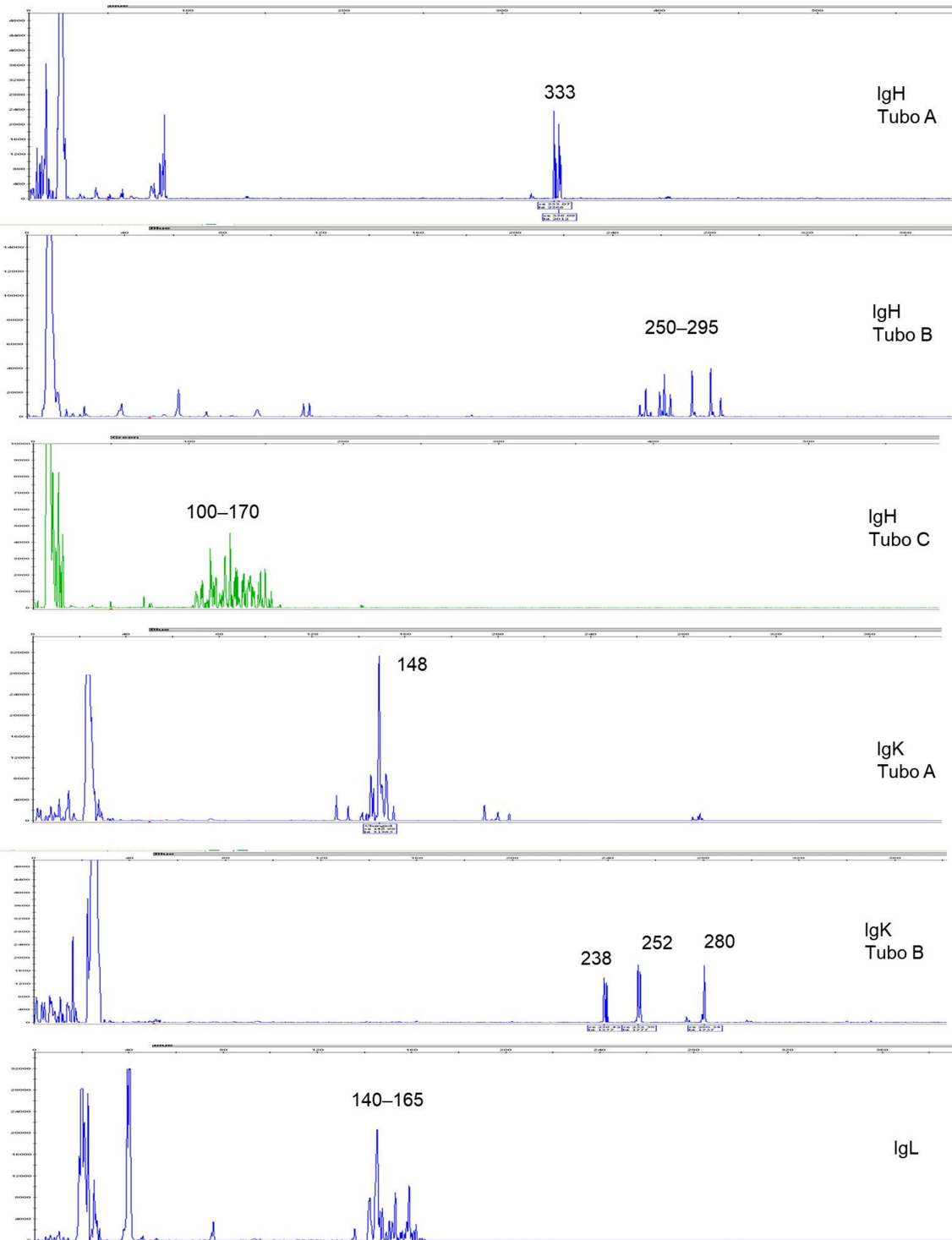
Caso 13 – material proveniente de bloco parafinado e fixado em formol



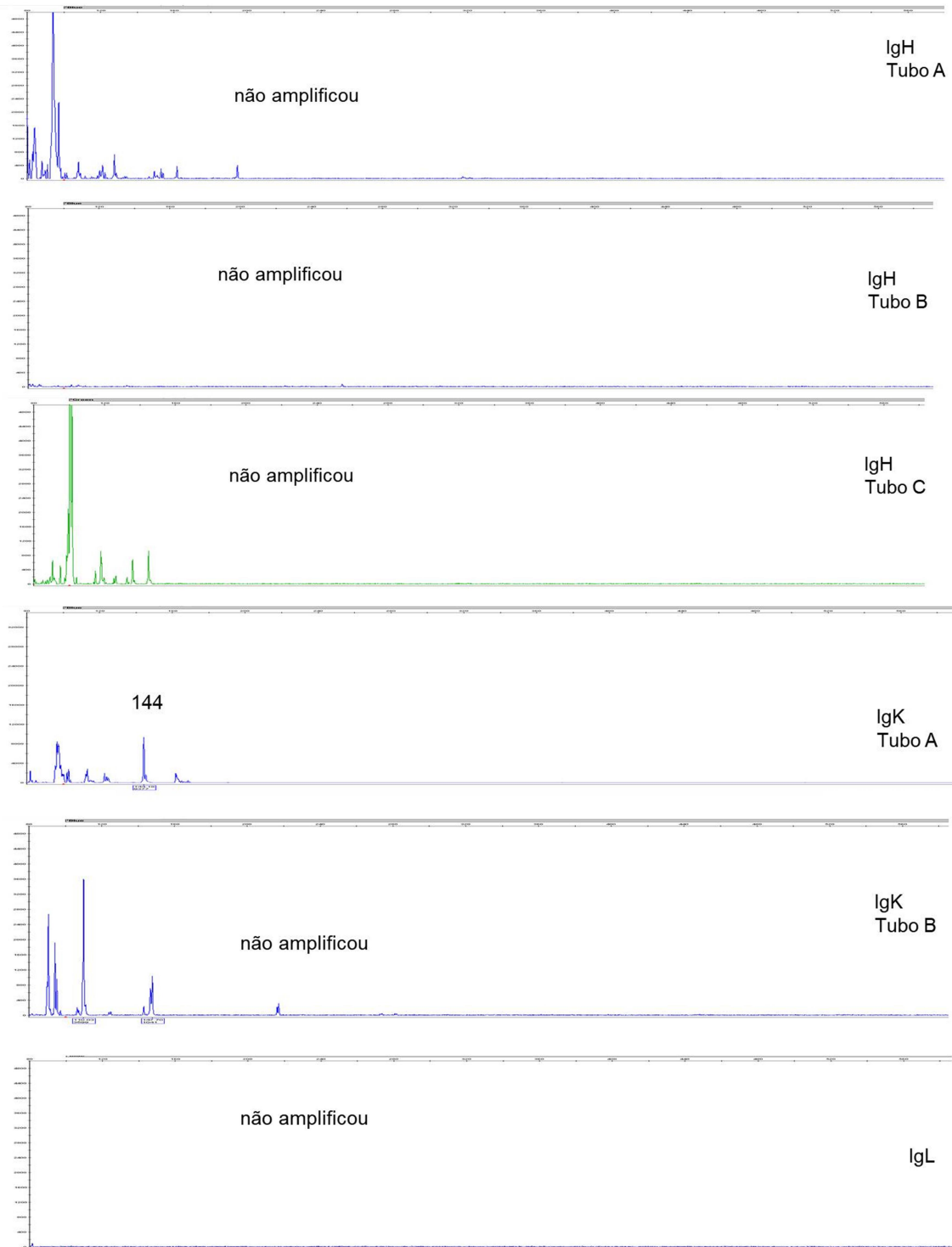
Caso 13 – material proveniente de pele congelada



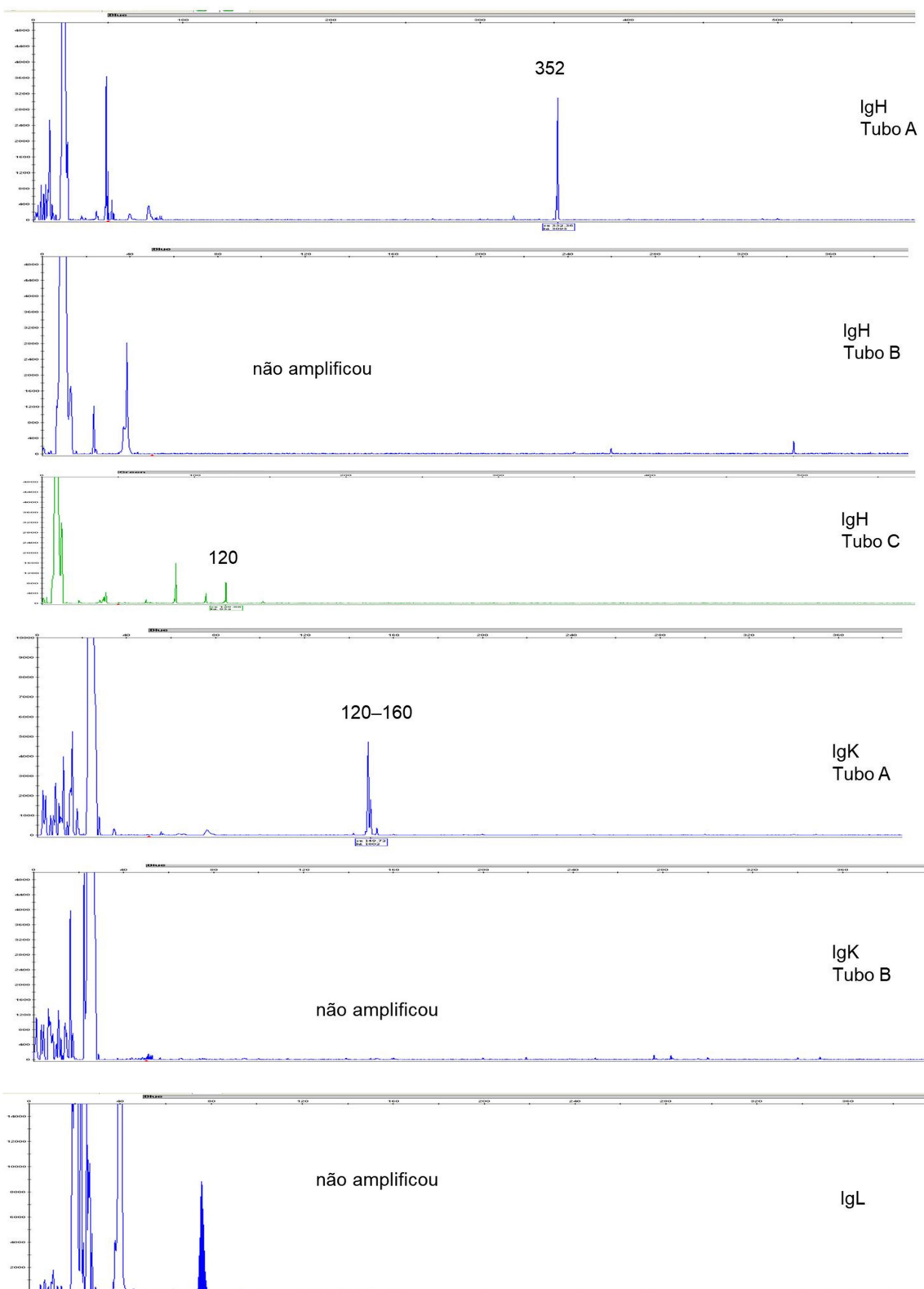
Caso 14



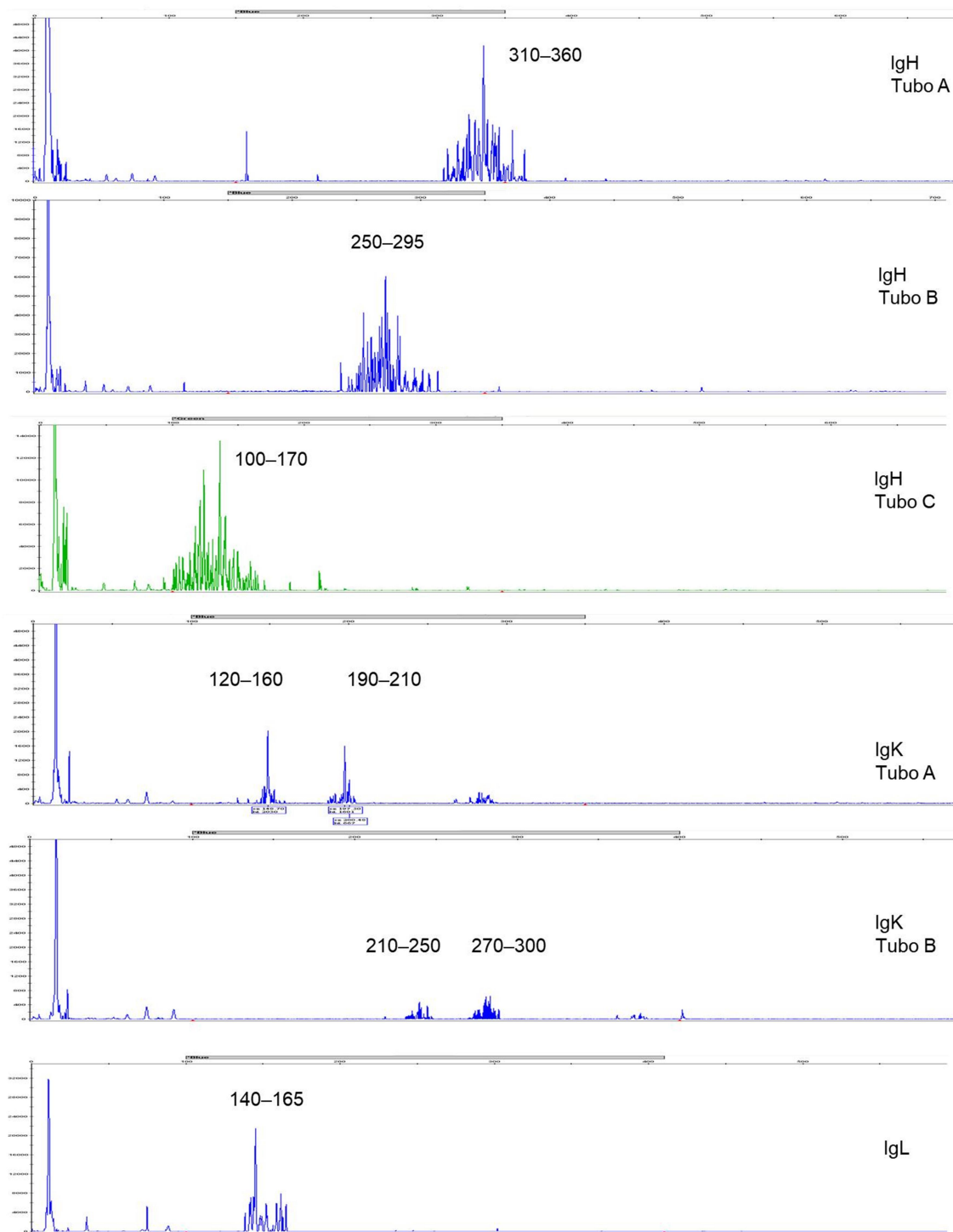
Caso 15



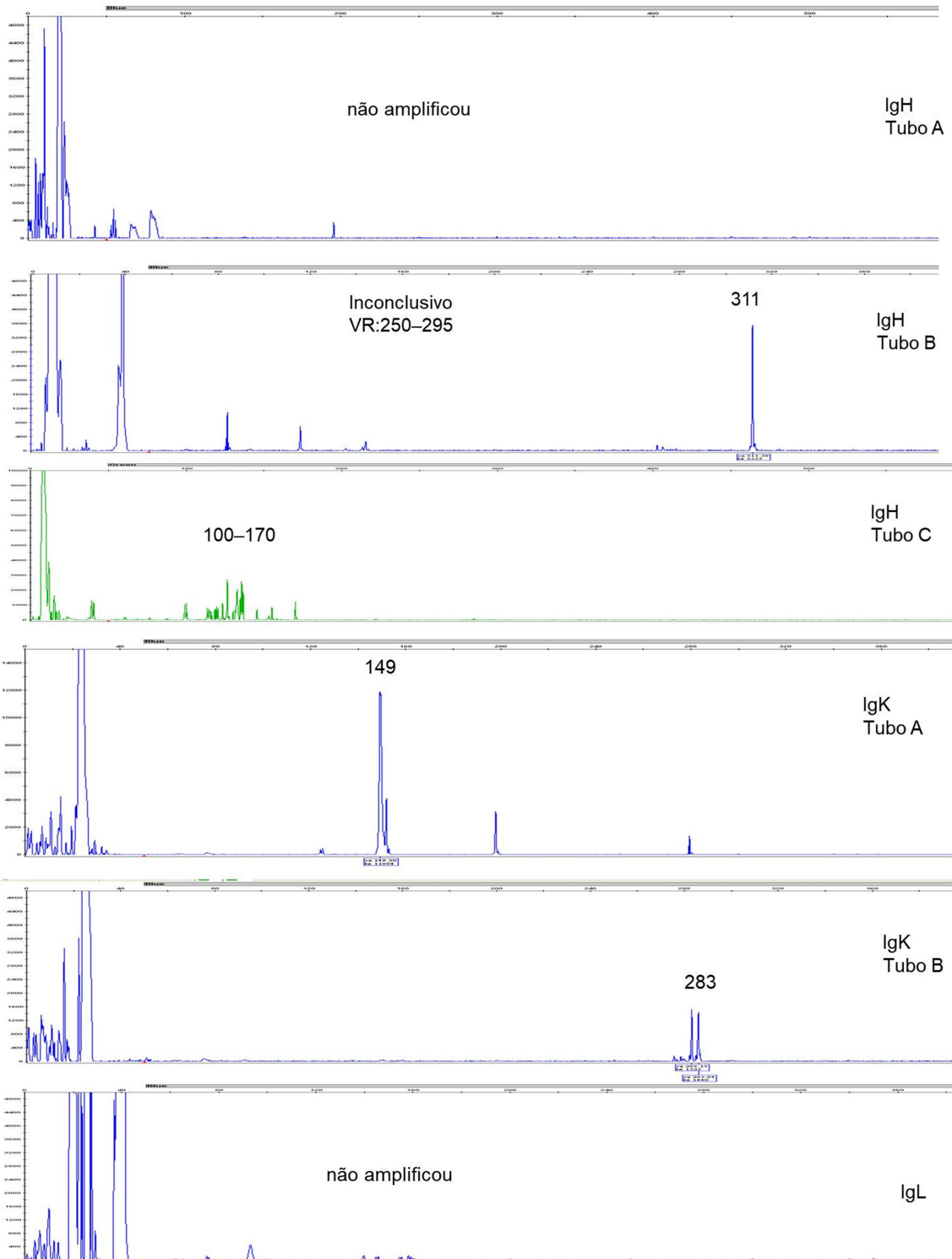
Caso 16



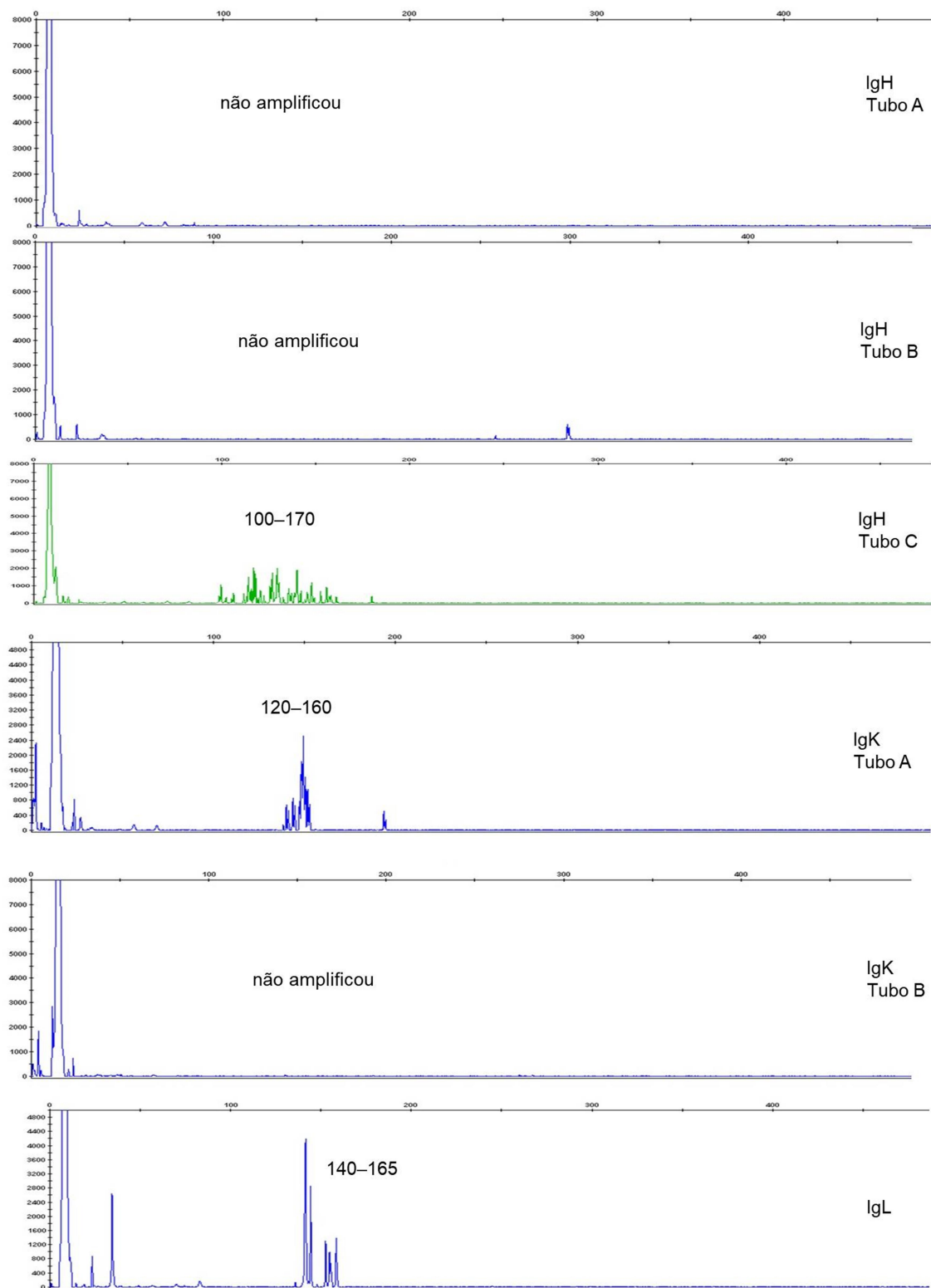
Caso 17



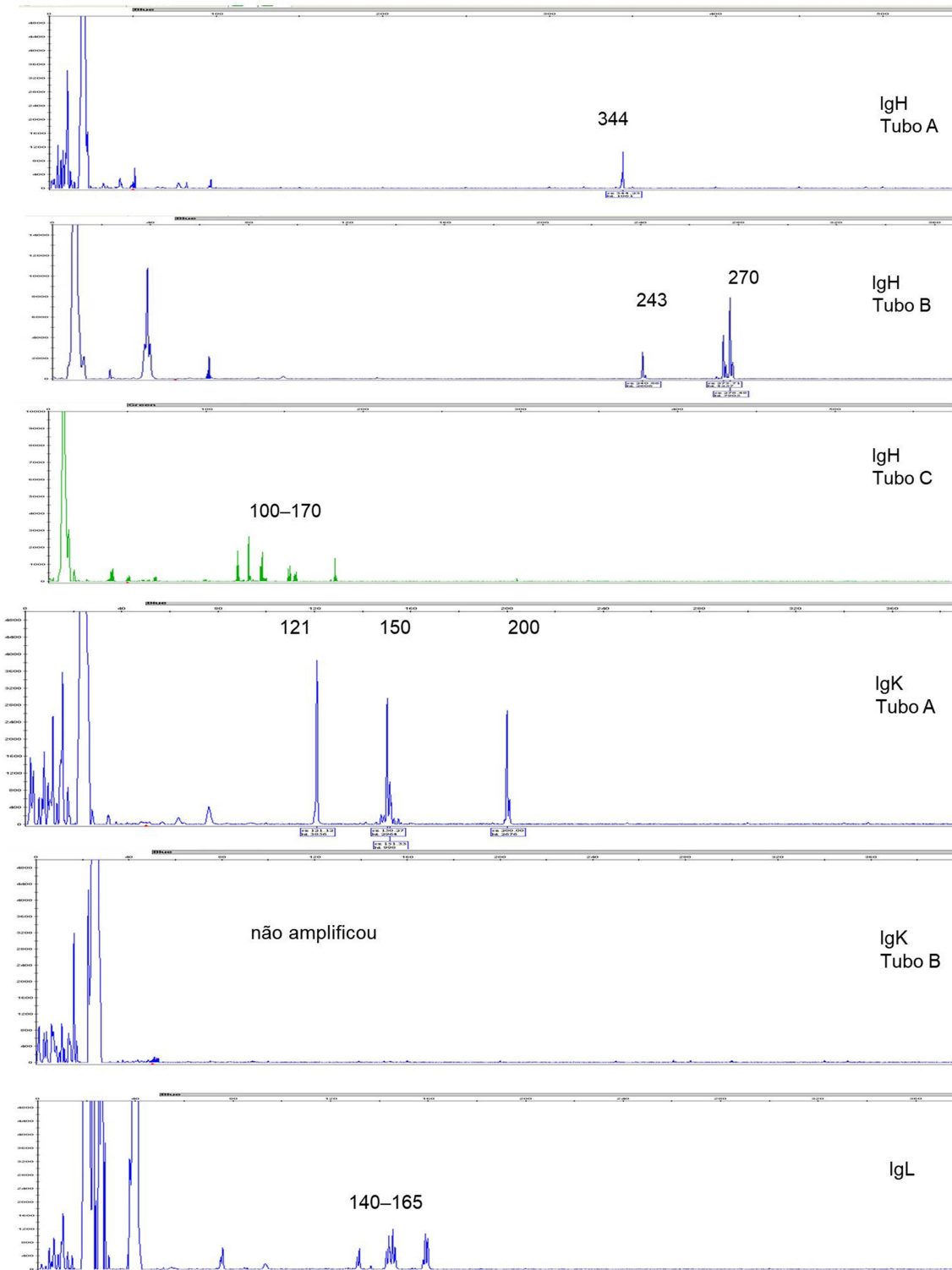
Caso 18



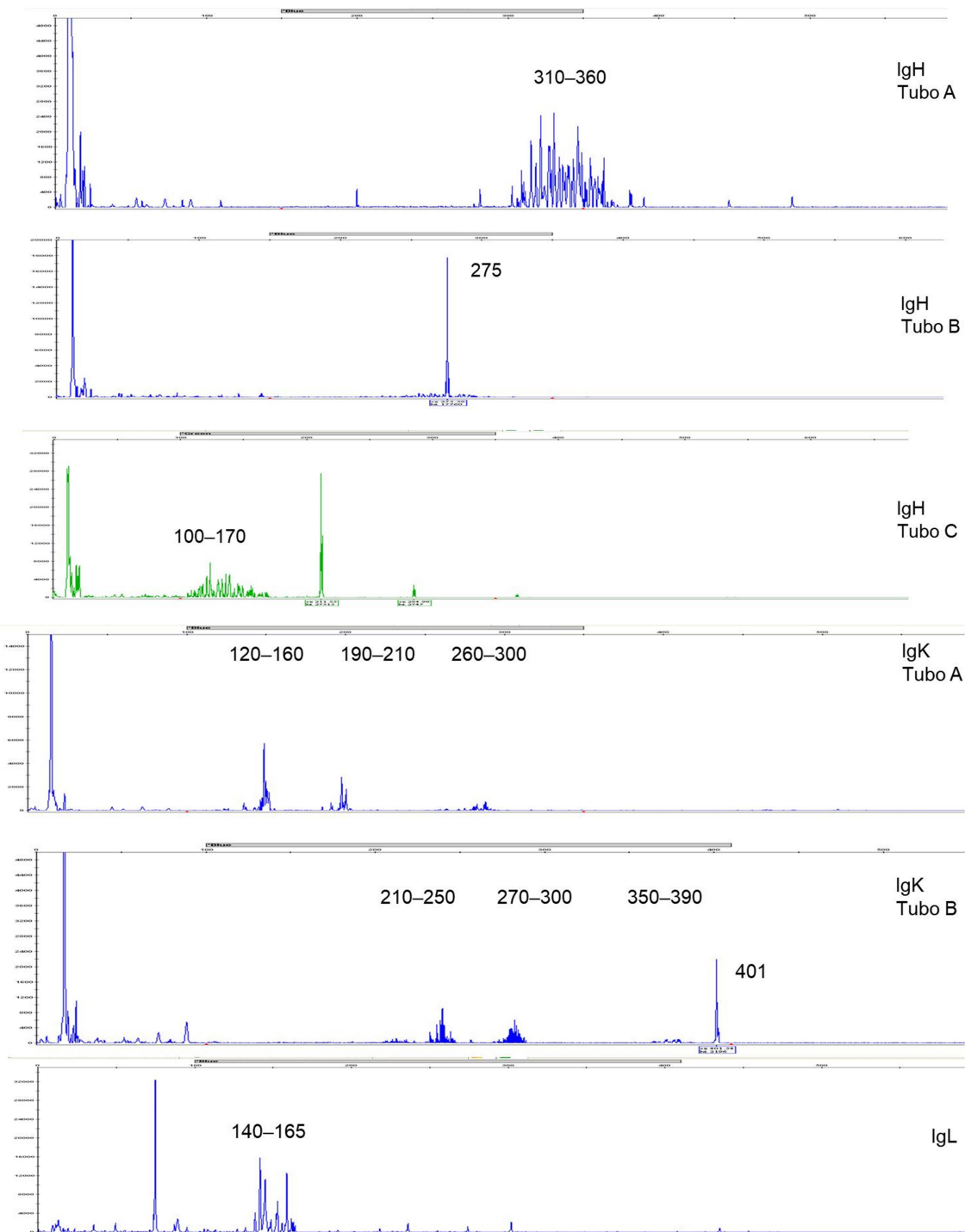
Caso 19



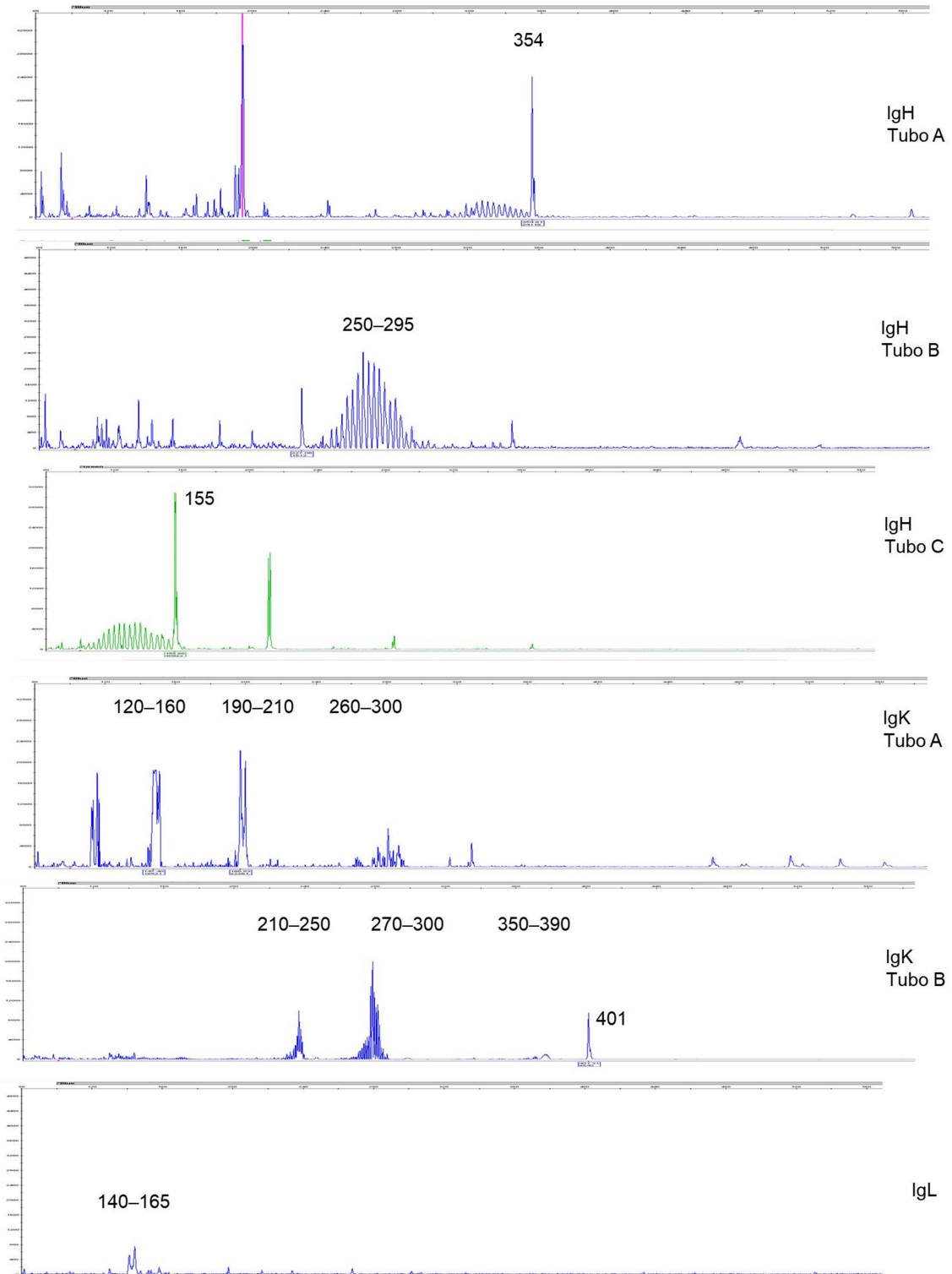
Caso 20



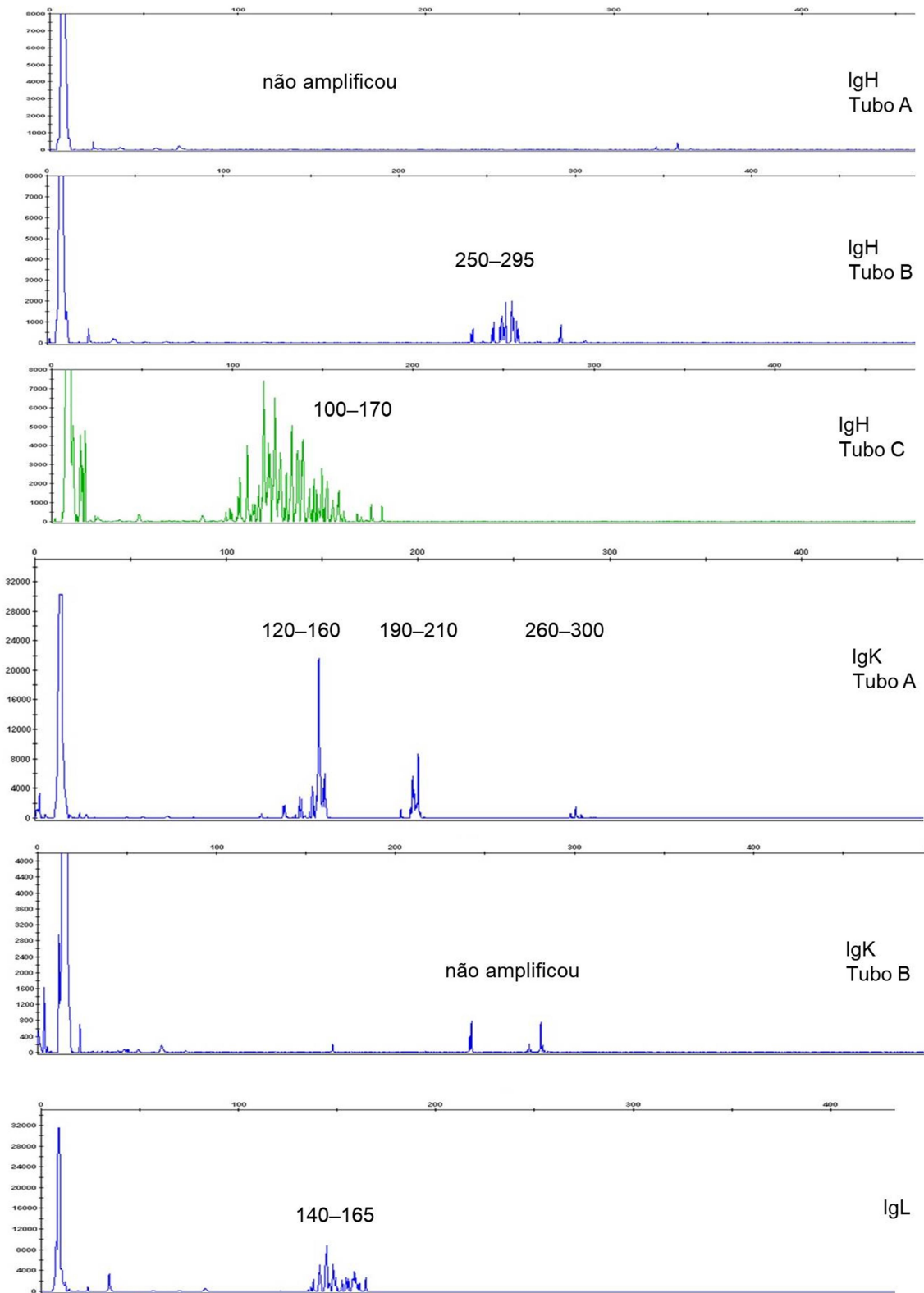
Caso 21



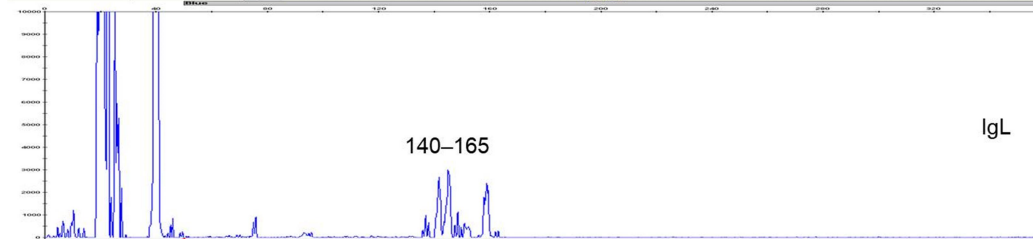
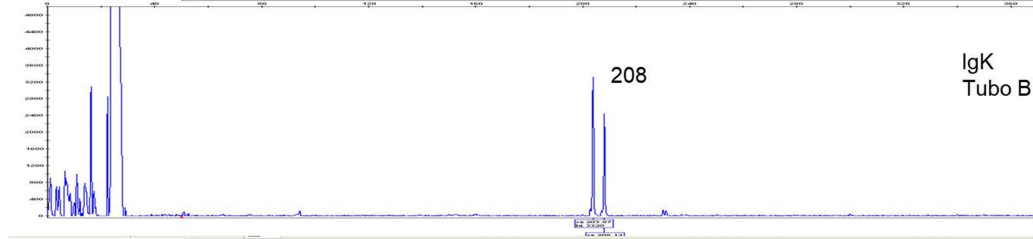
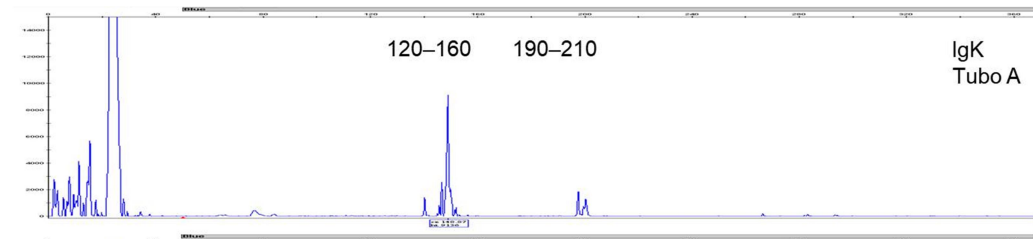
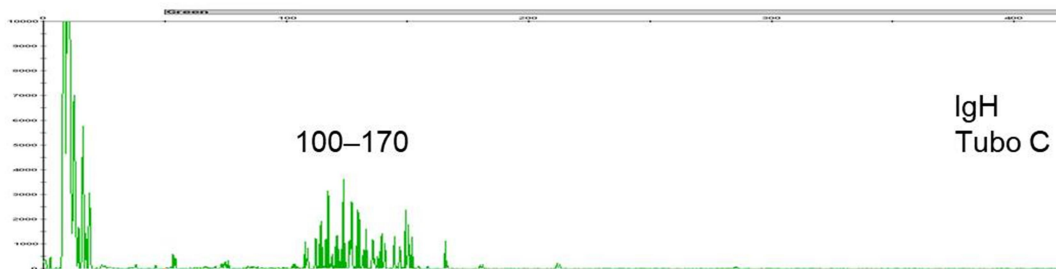
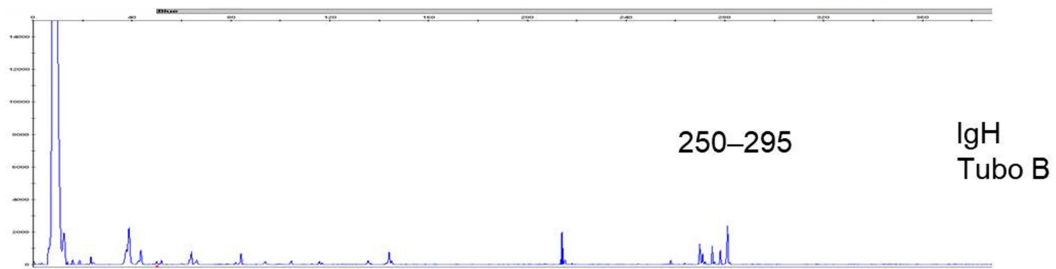
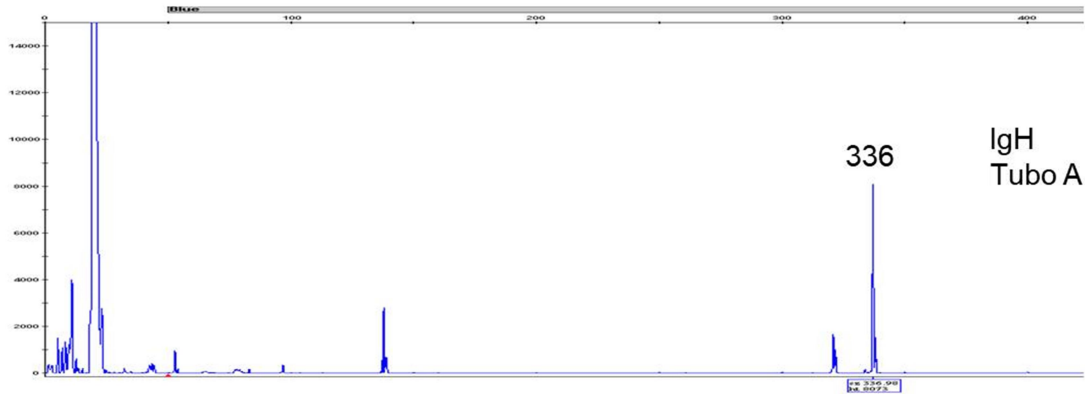
Caso 22



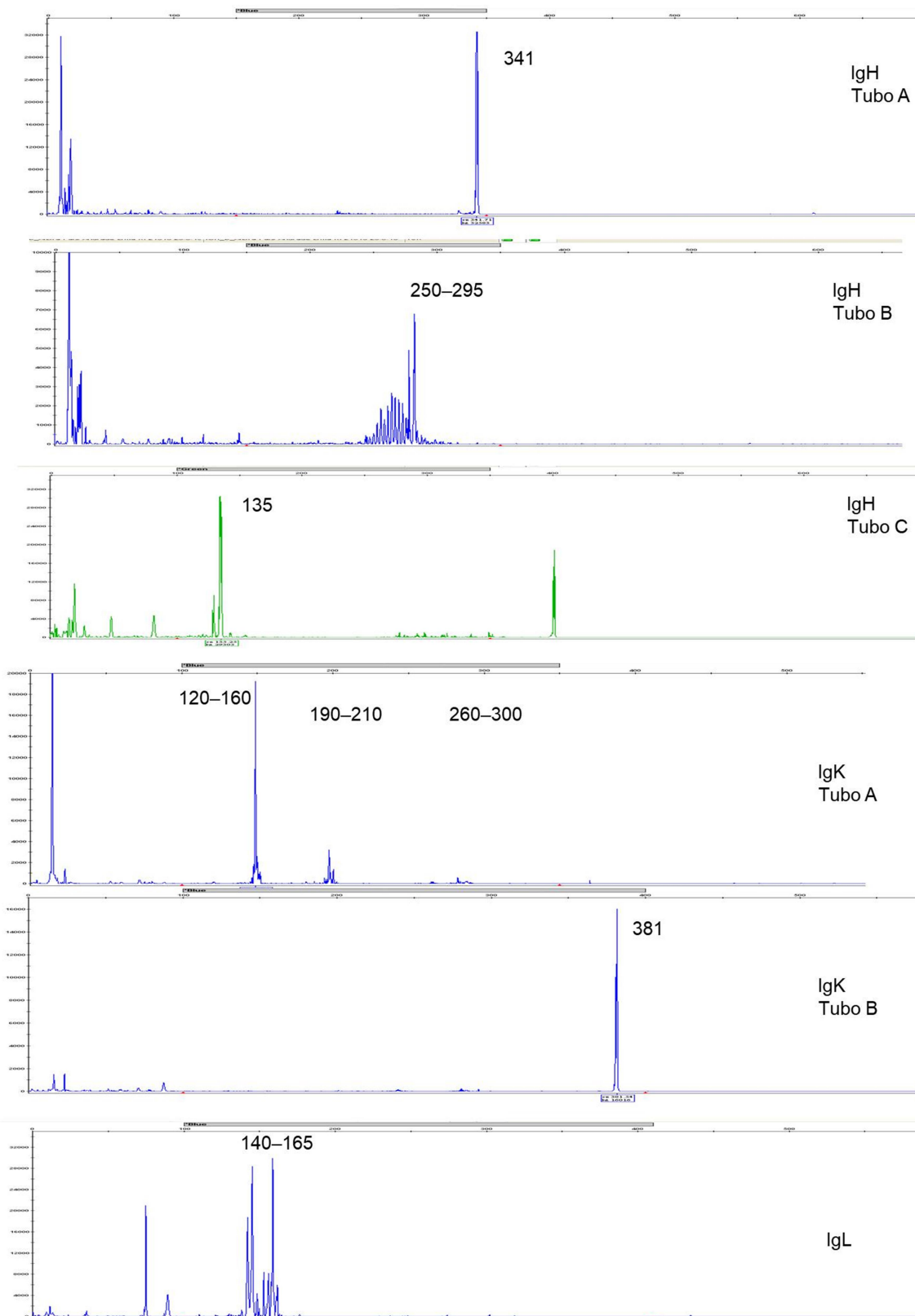
Caso 23



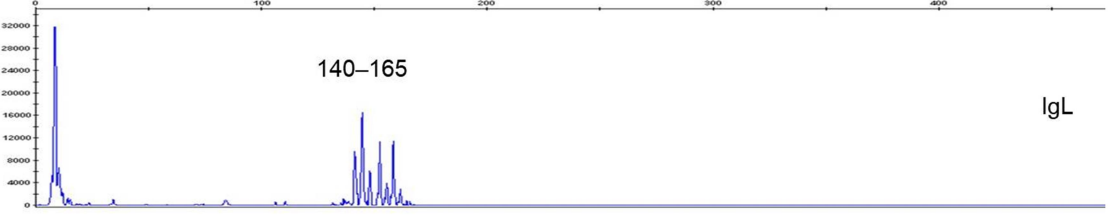
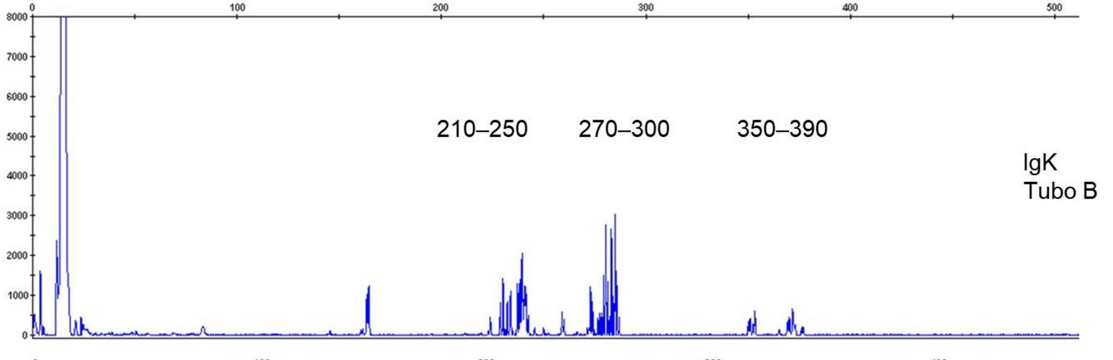
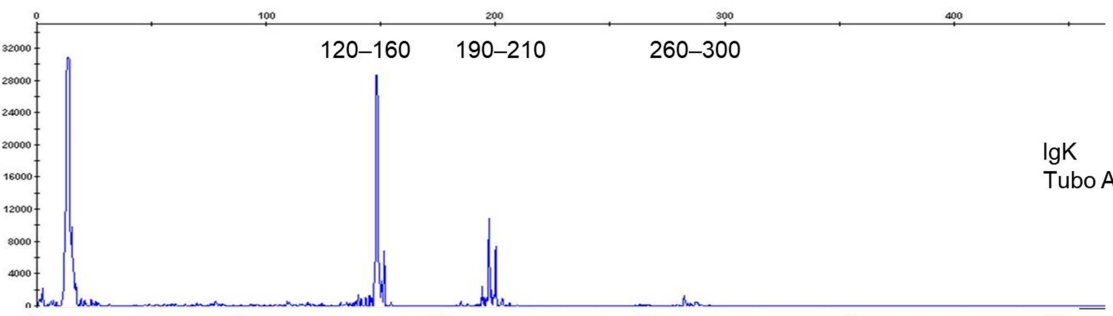
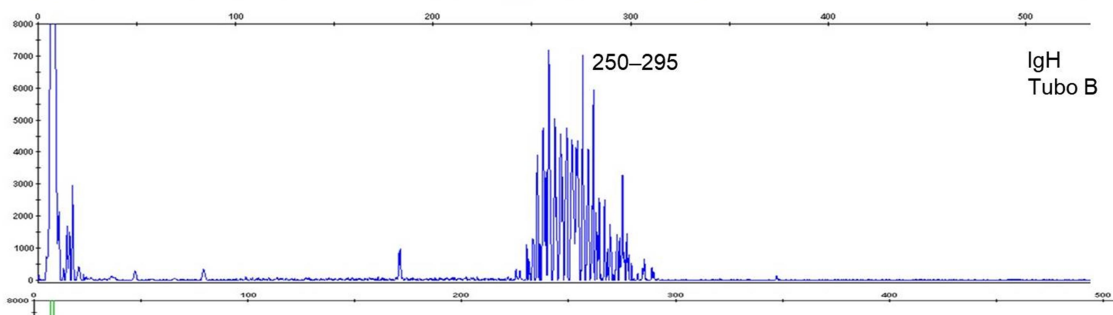
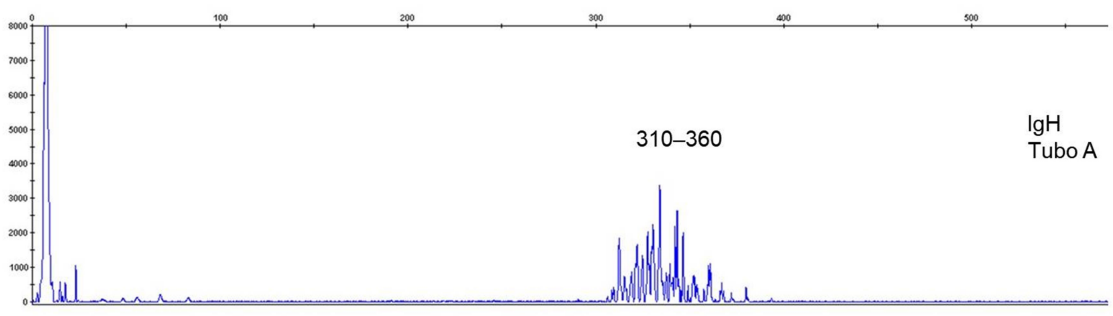
Caso 24



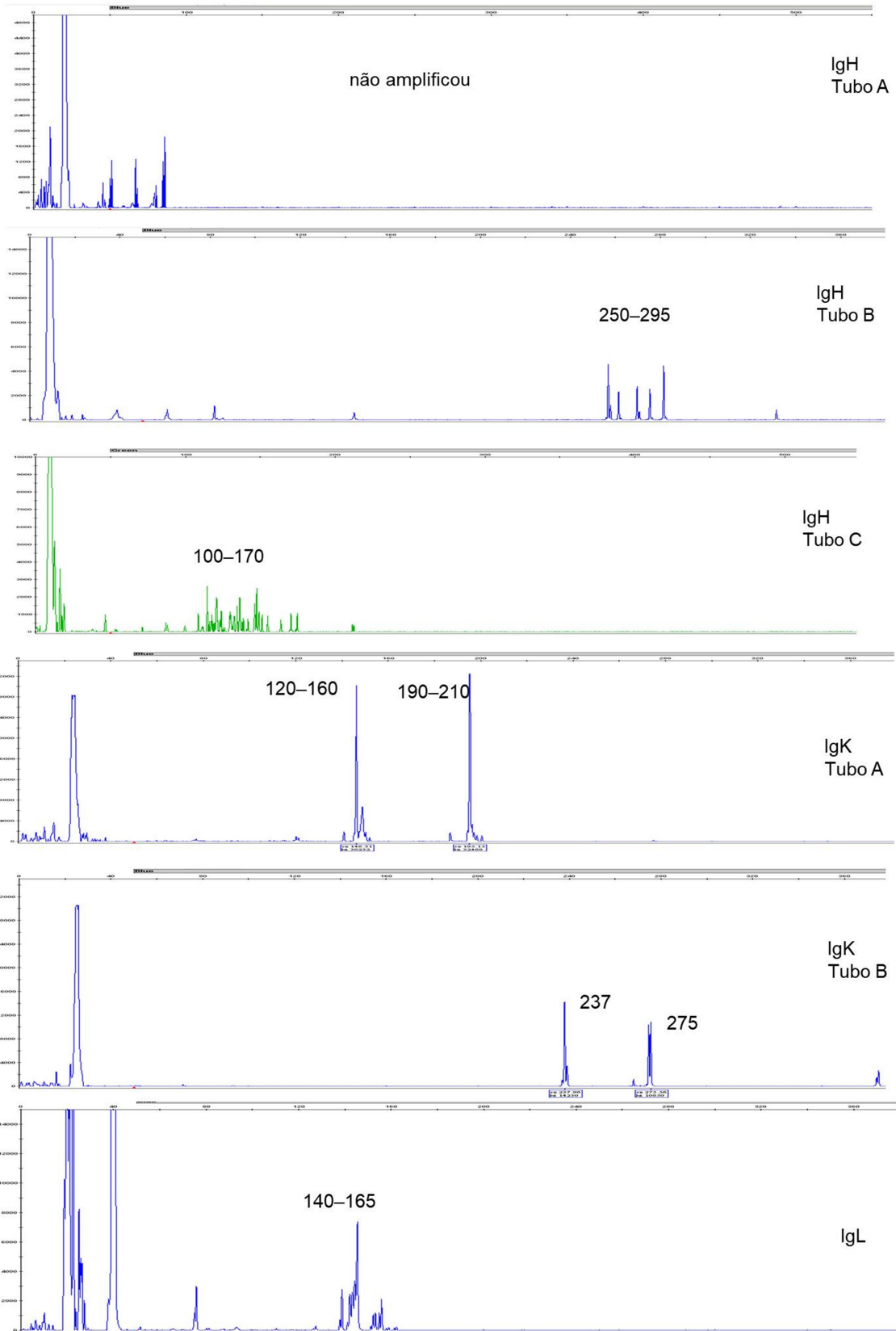
Caso 25



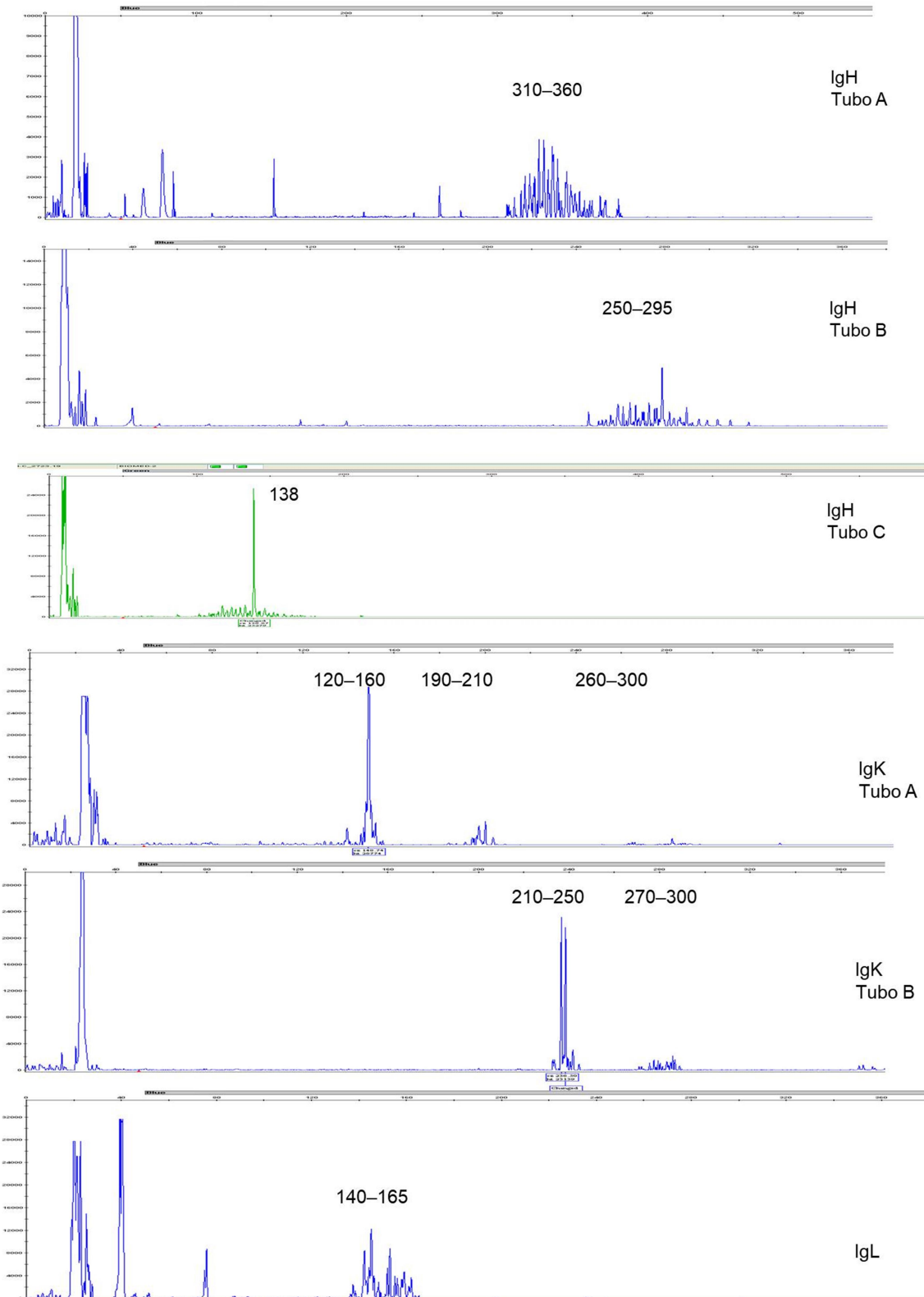
Caso 26



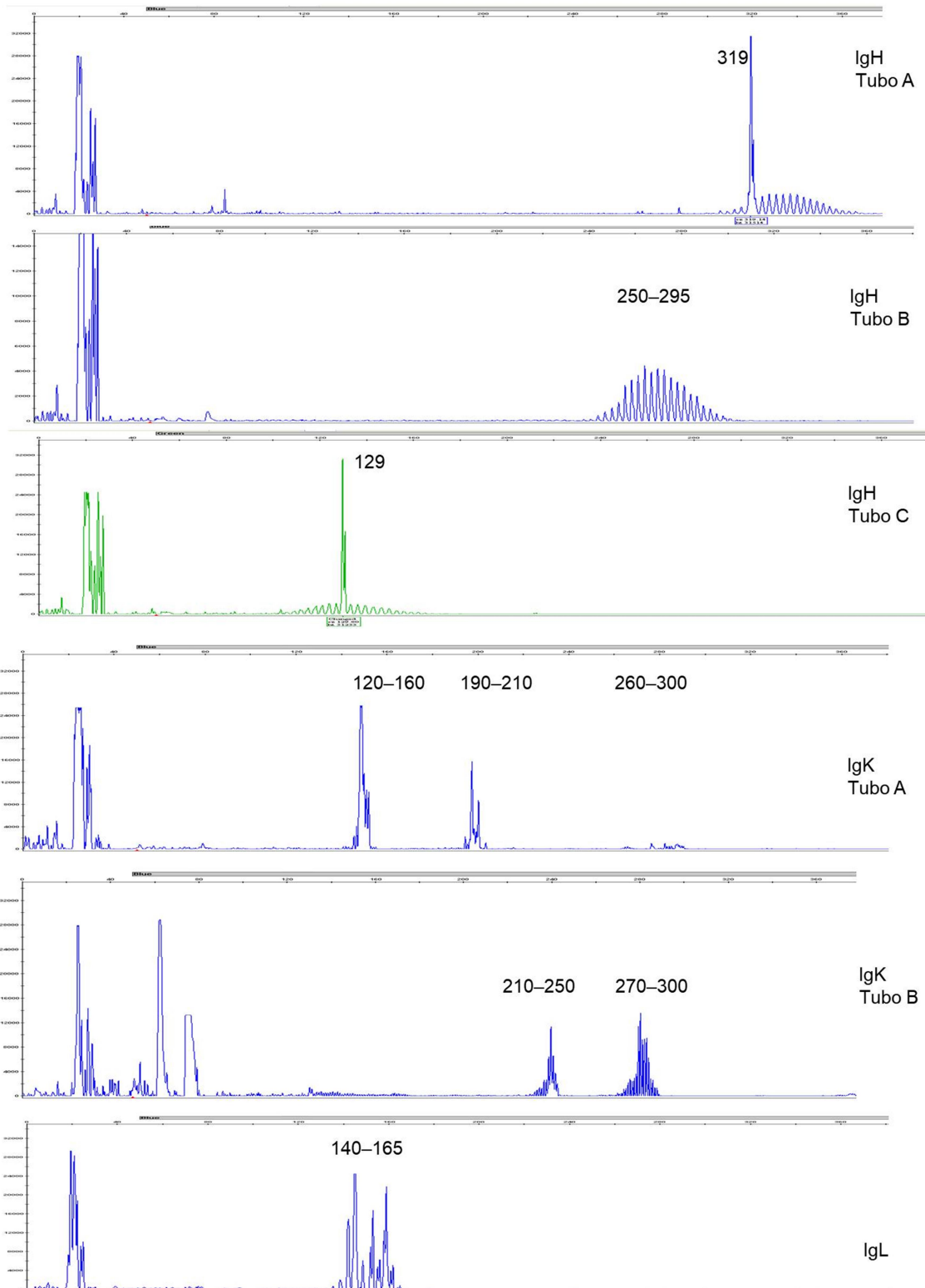
Caso 27



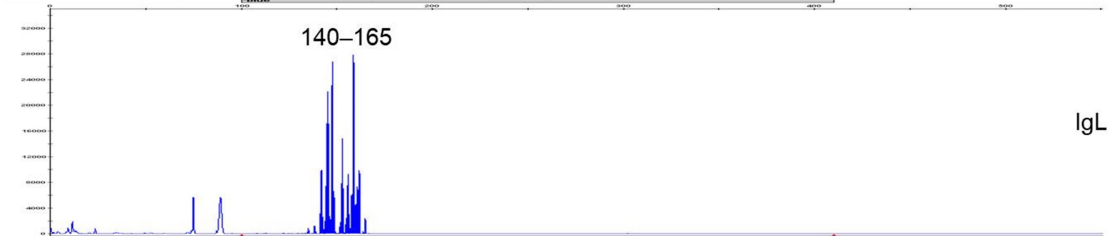
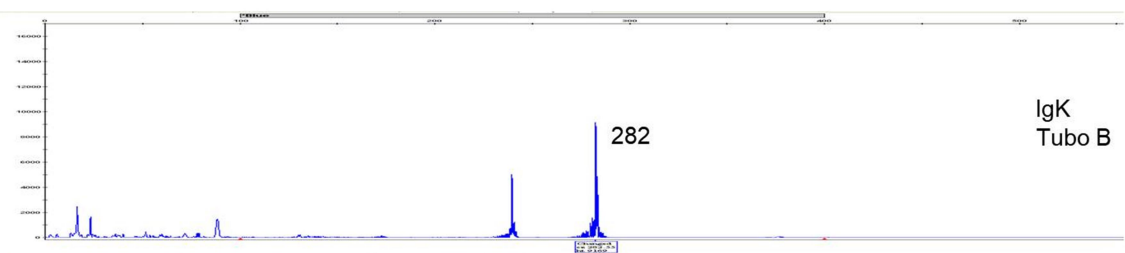
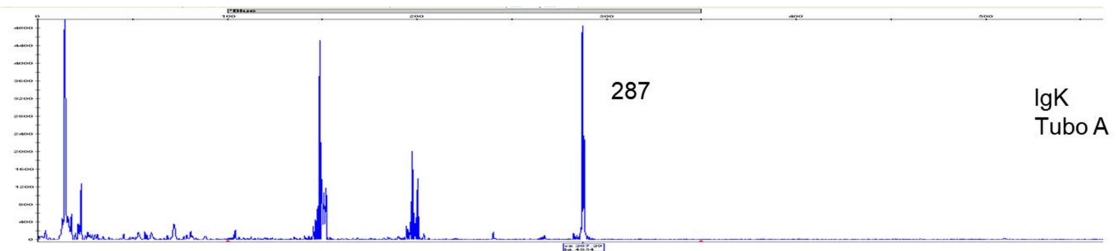
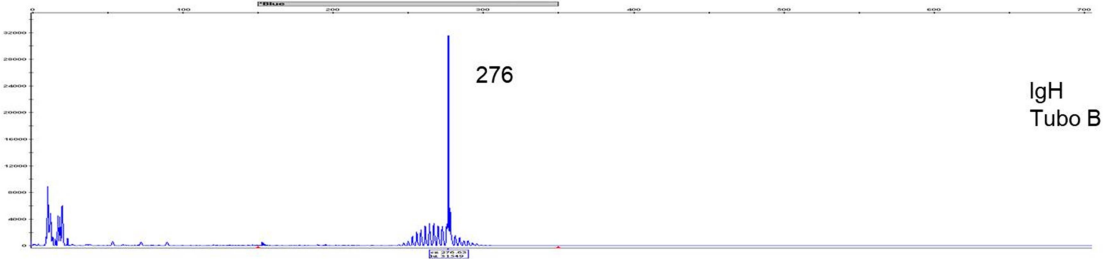
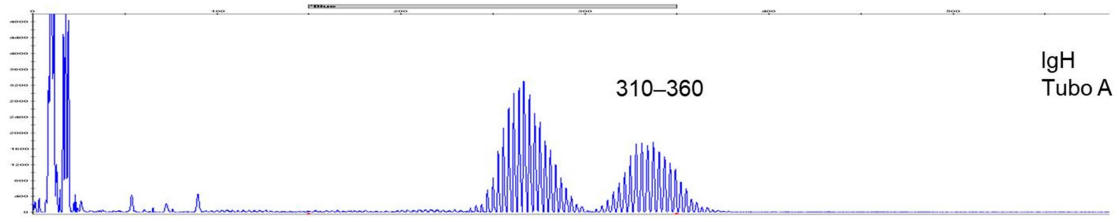
Caso 28 - material proveniente de bloco parafinado e fixado em formol



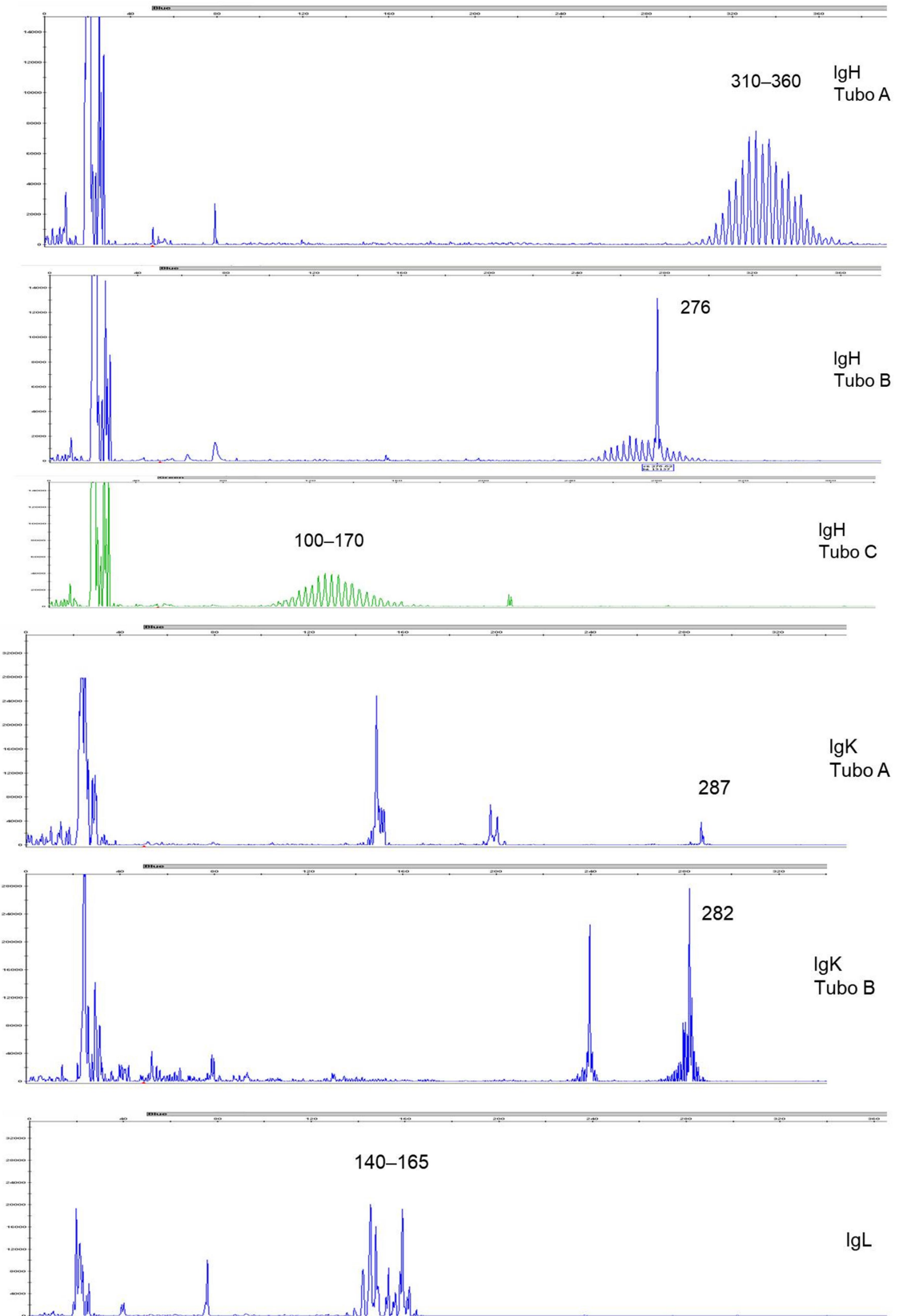
Caso 28 - material proveniente de pele congelada



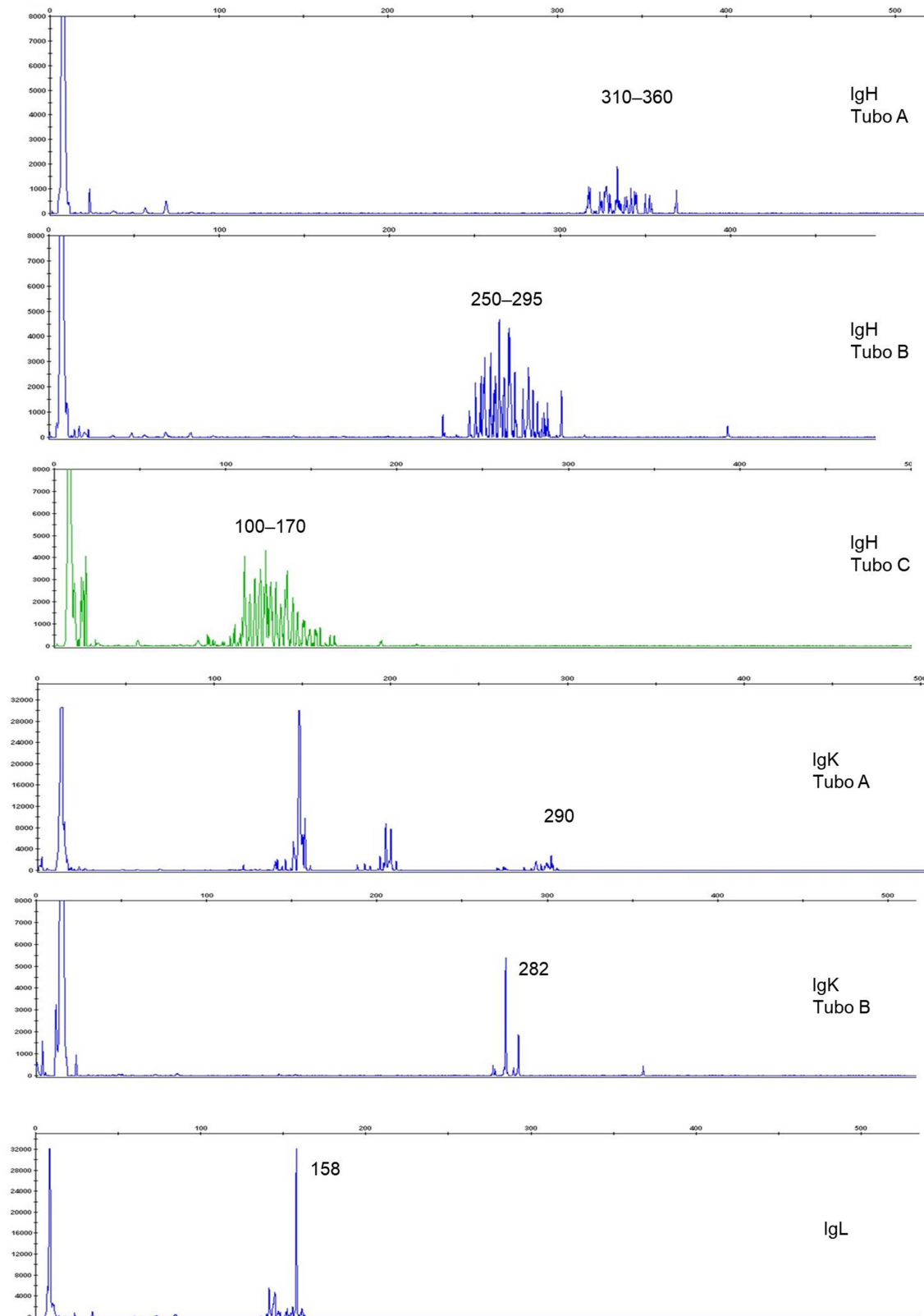
Caso 29 – amostra 1



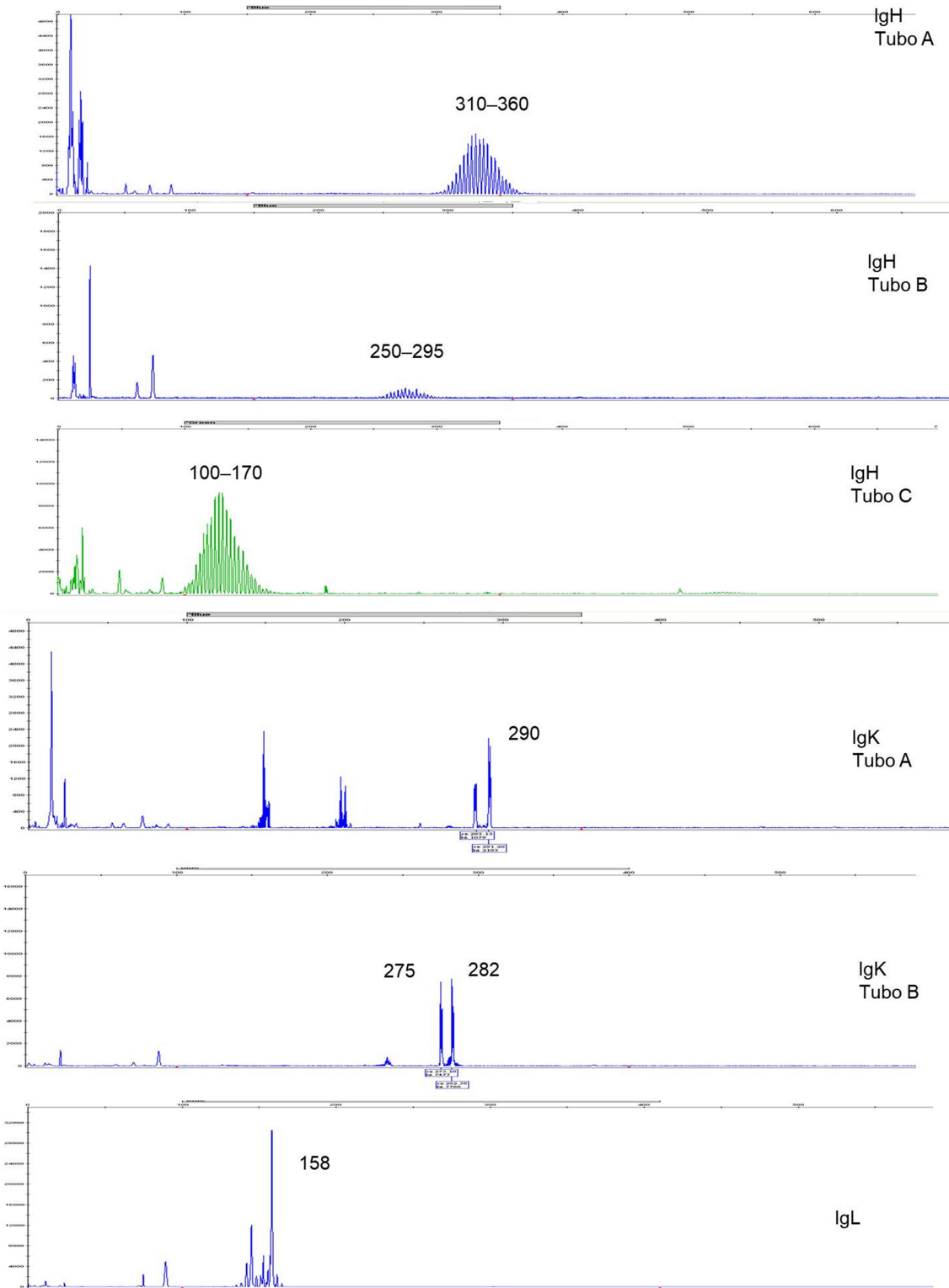
Caso 29 – amostra 2



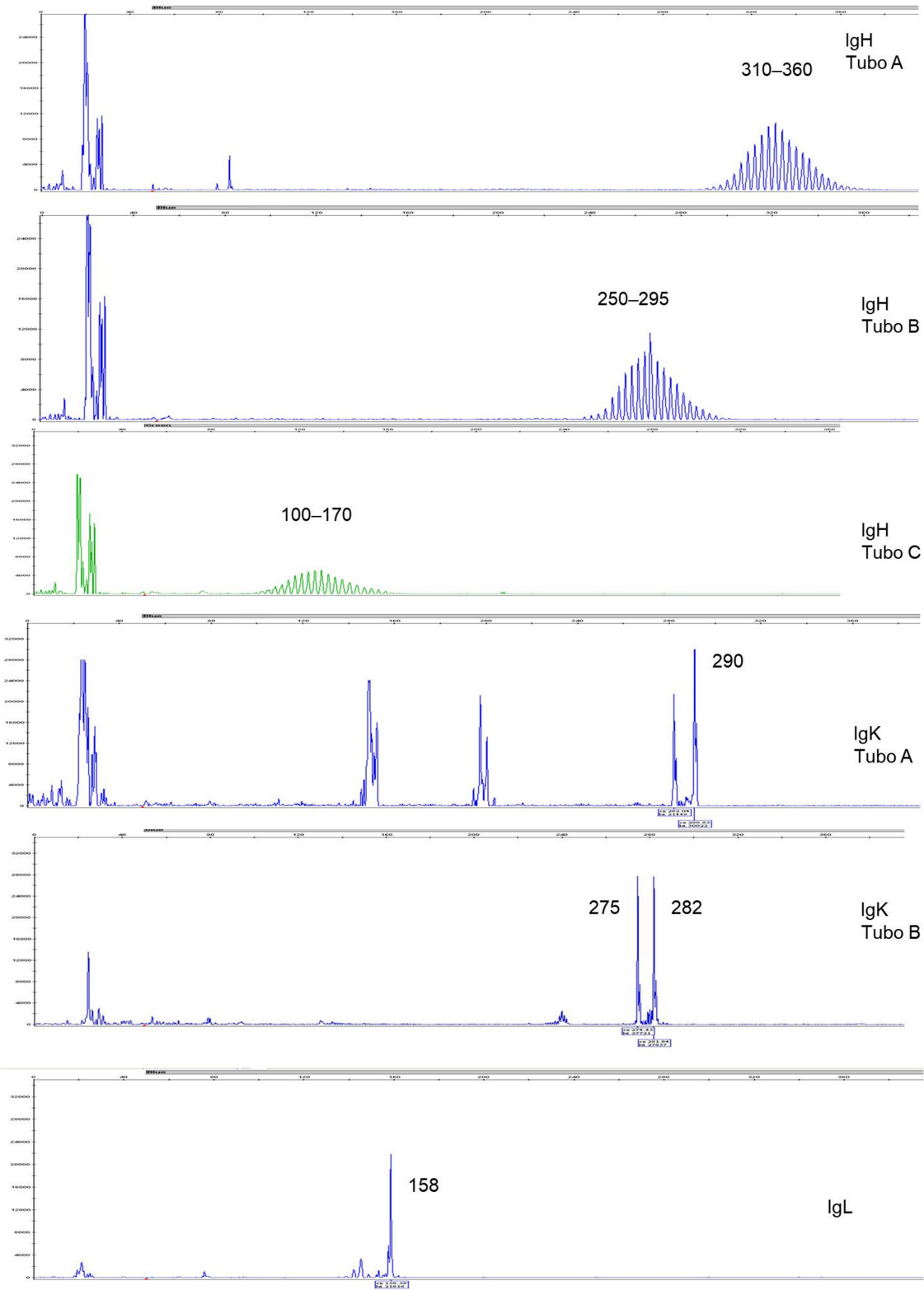
Caso 30 - material proveniente de bloco parafinado e fixado em formol



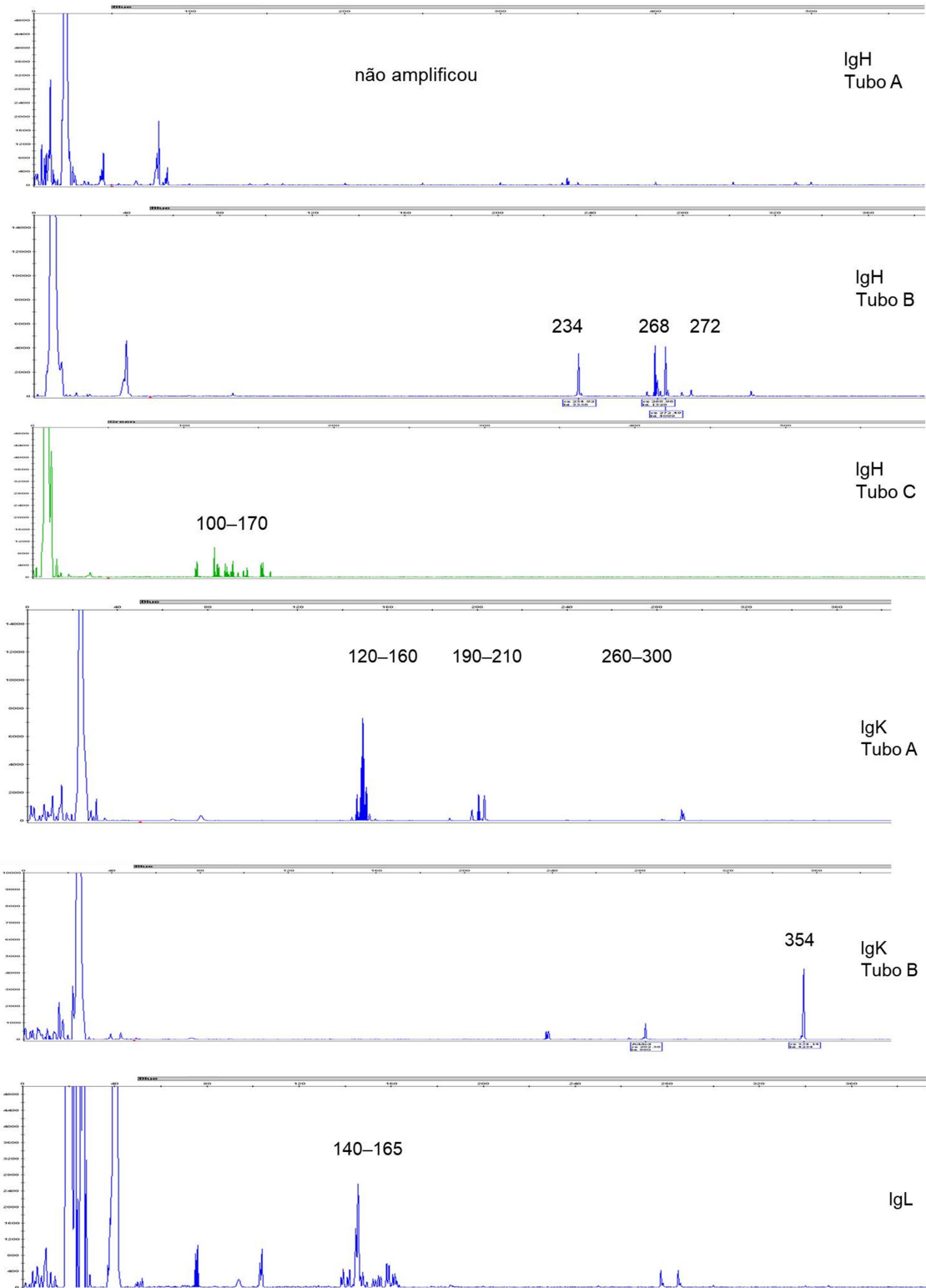
Caso 30 – amostra 1 - material proveniente de pele congelada



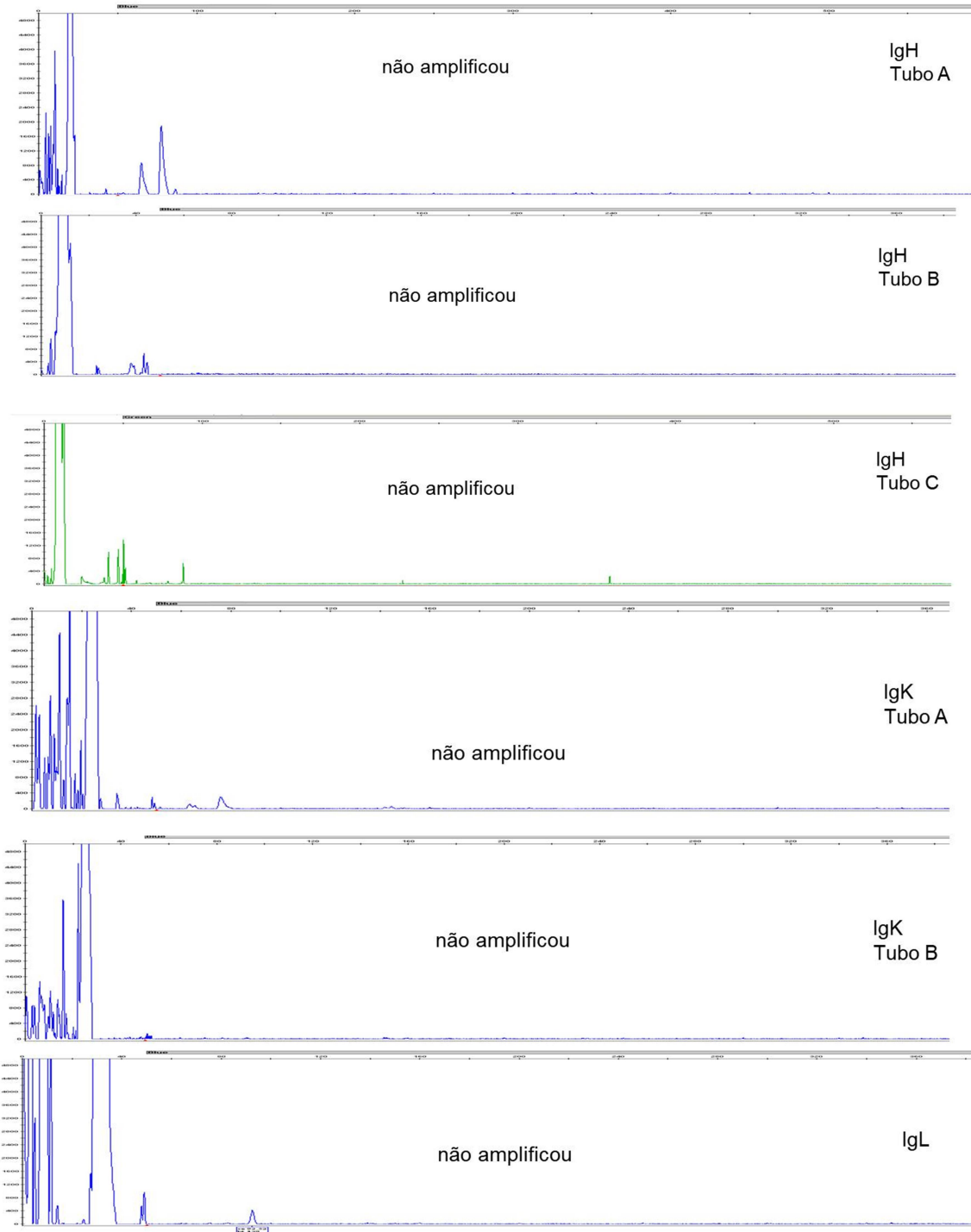
Caso 30 – amostra 2 - material proveniente de pele congelada



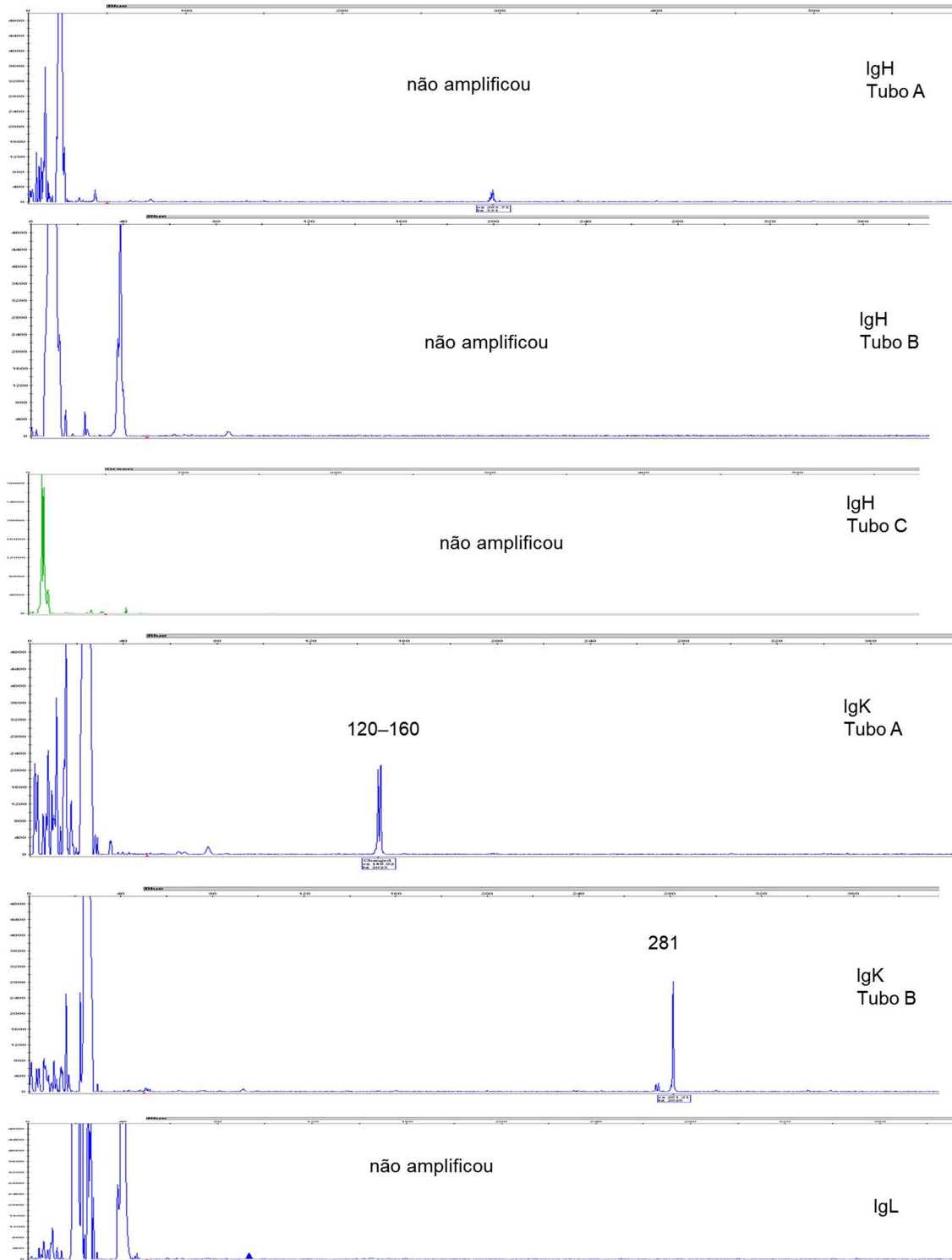
Caso 31



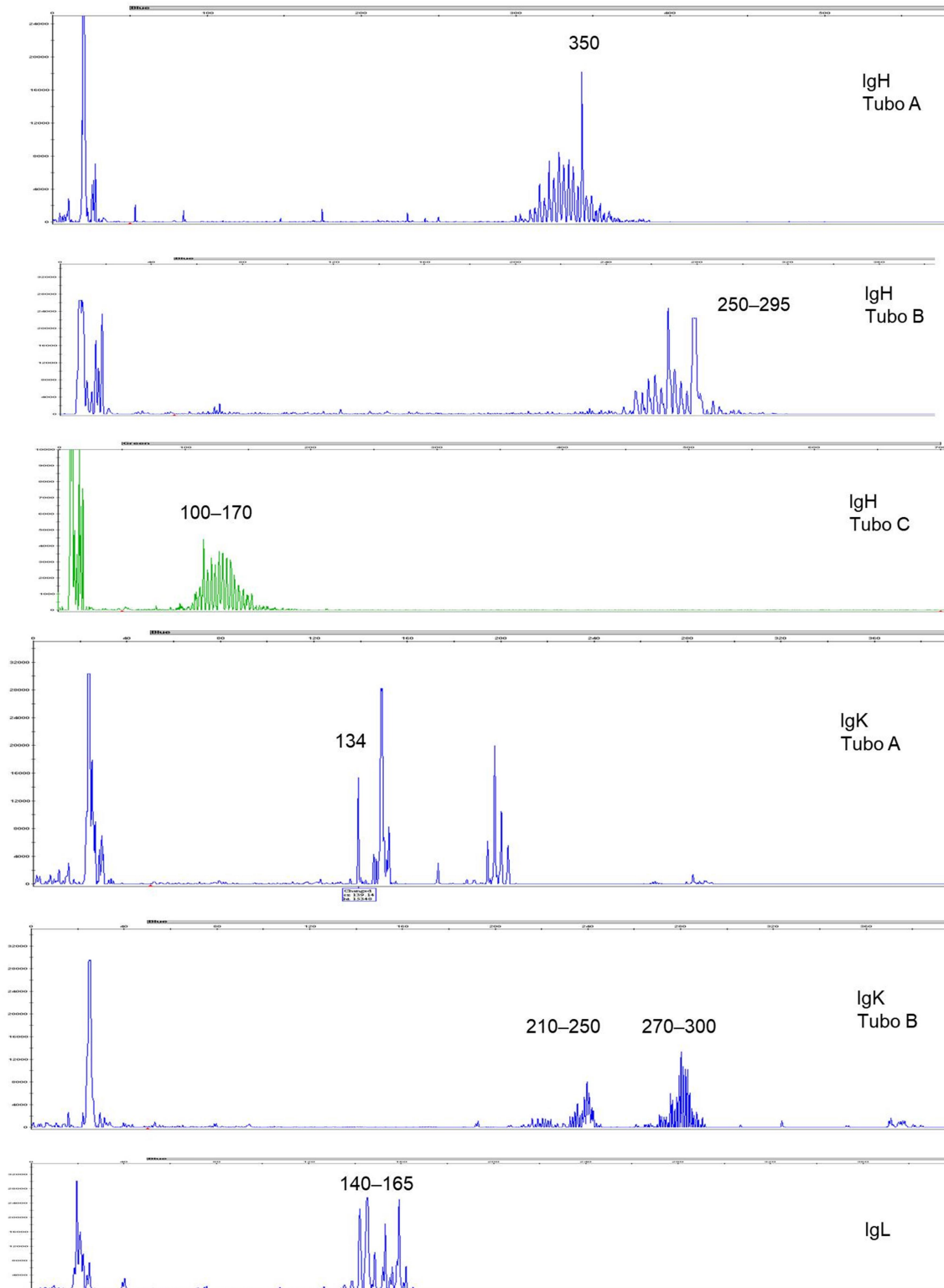
Caso 32



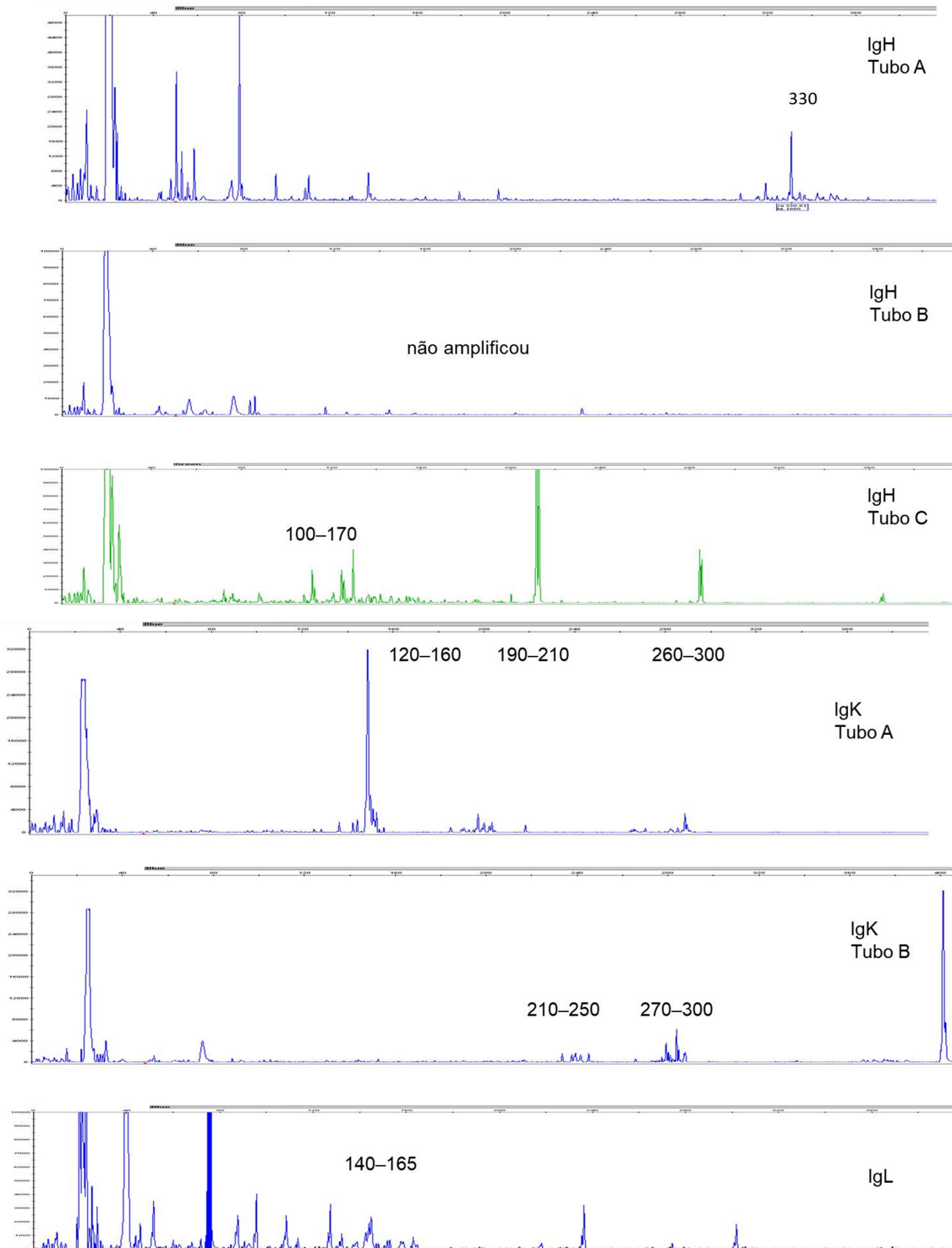
Caso 33



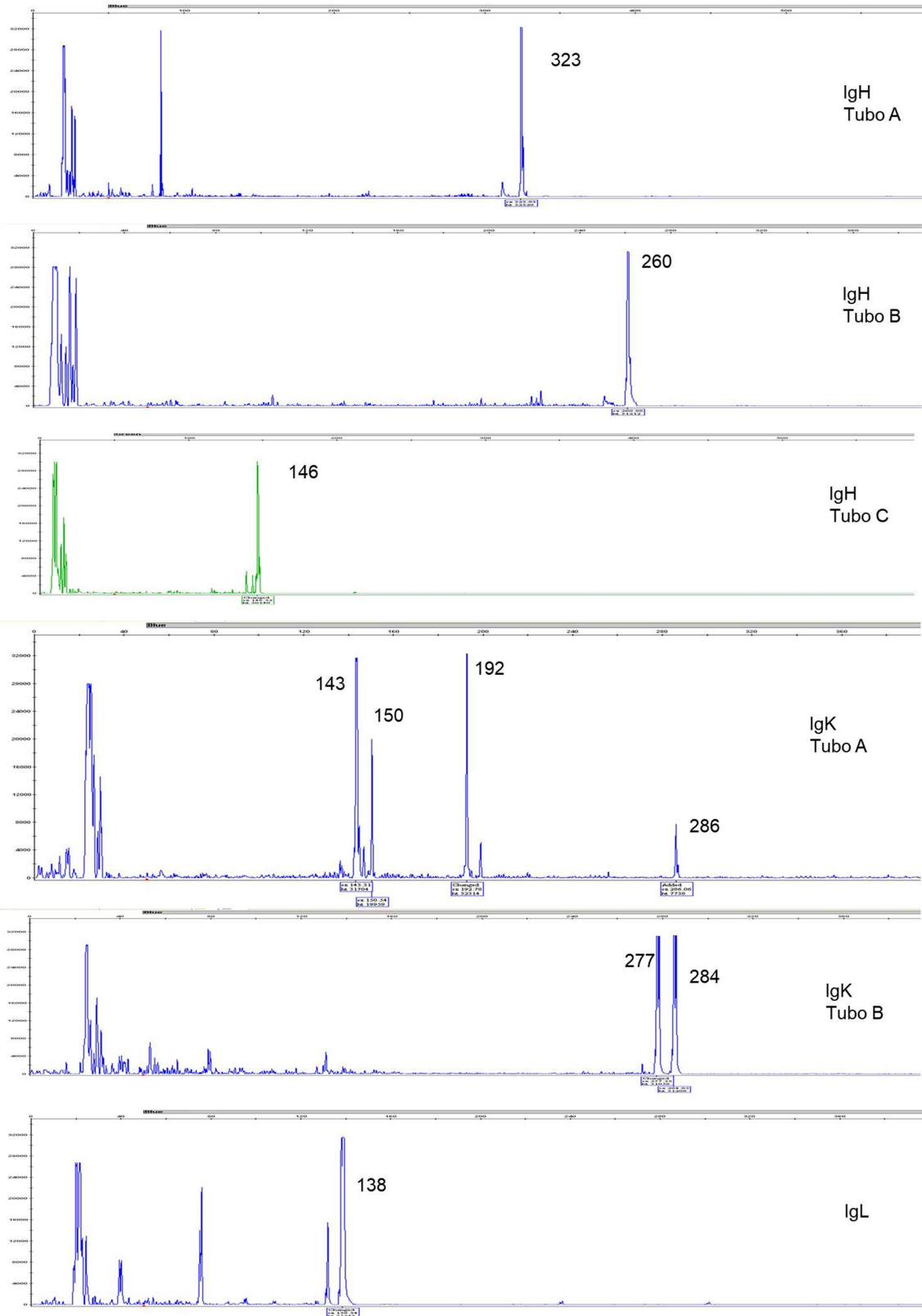
Caso 34



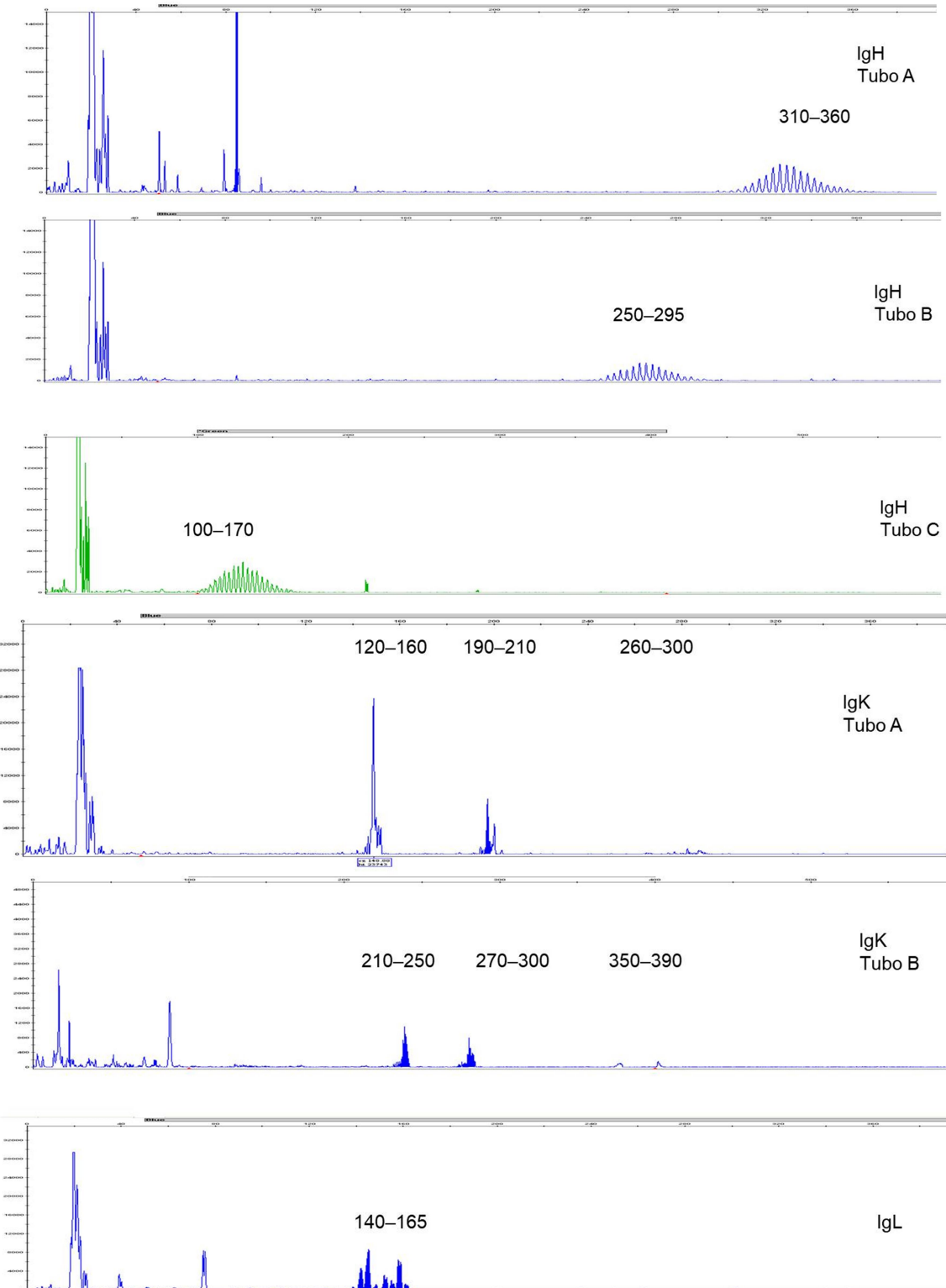
Caso 35



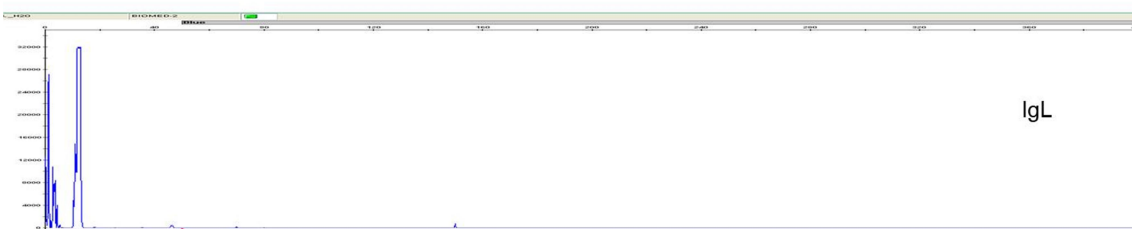
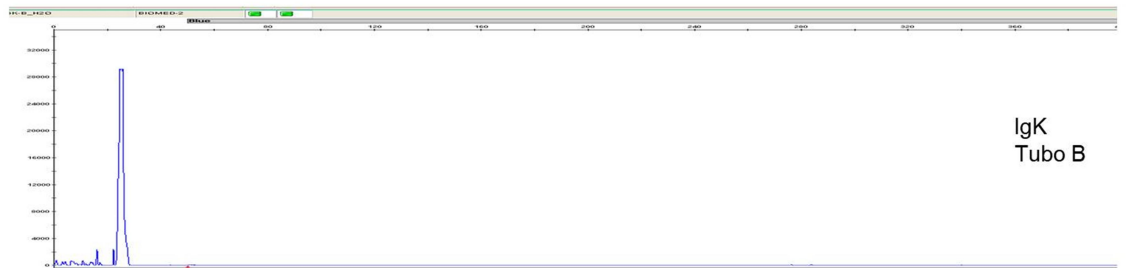
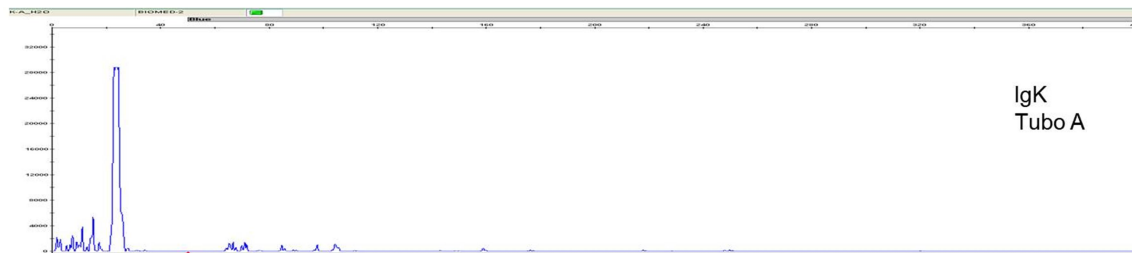
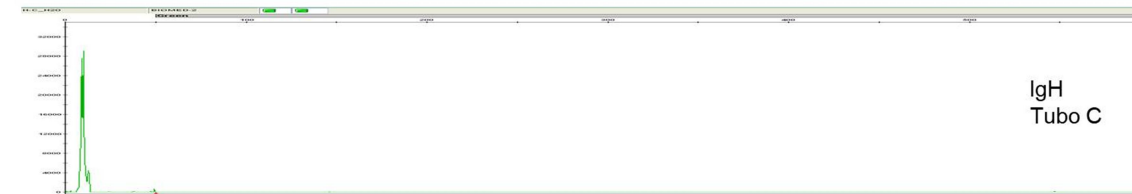
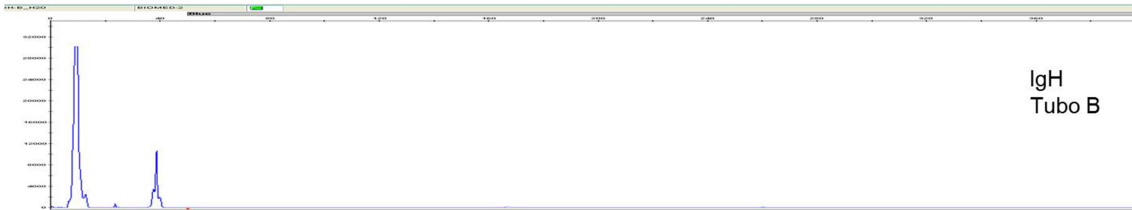
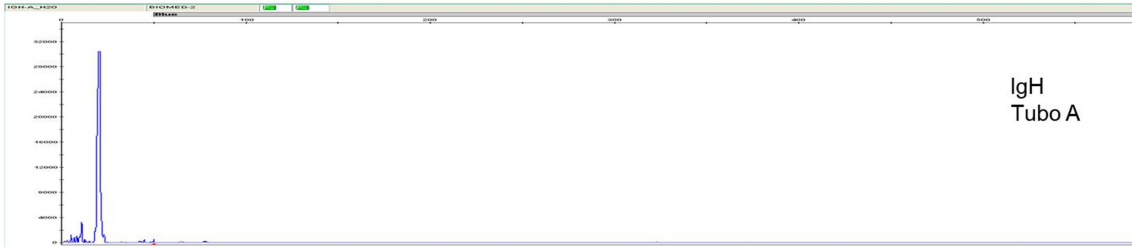
Controle monoclonal



Controle policlonal

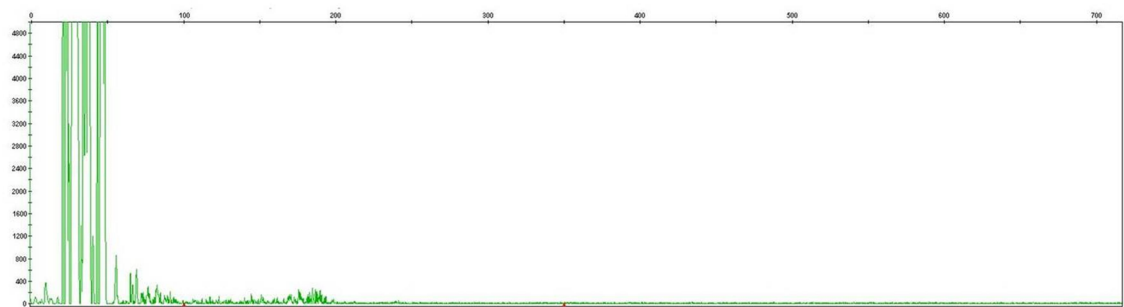
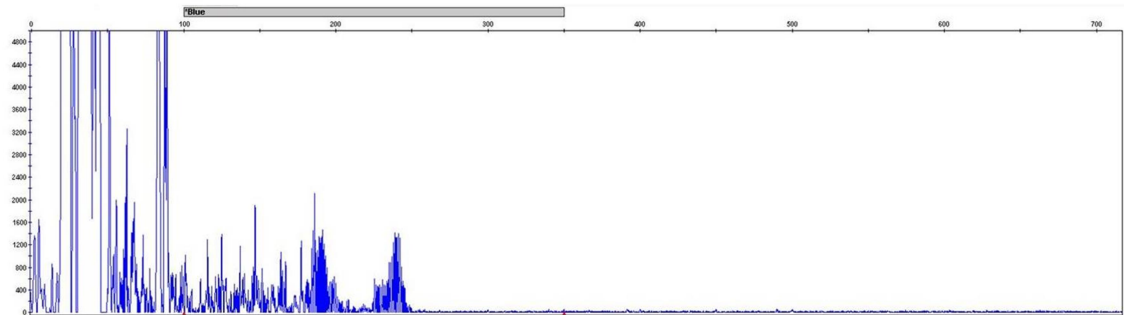


Controle água

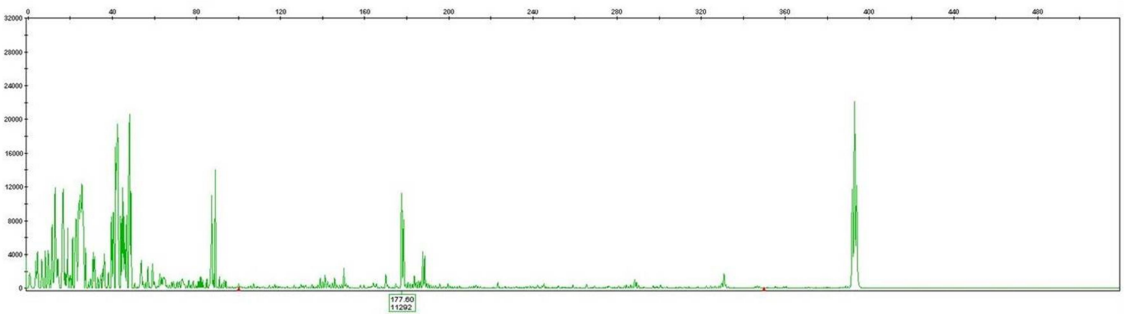
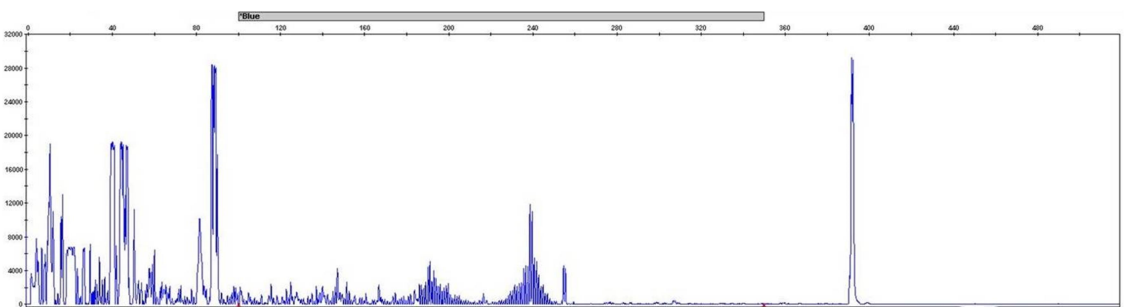


APÊNDICE U - Eletroferogramas referentes aos resultados da pesquisa de clonalidade T (TCR γ)

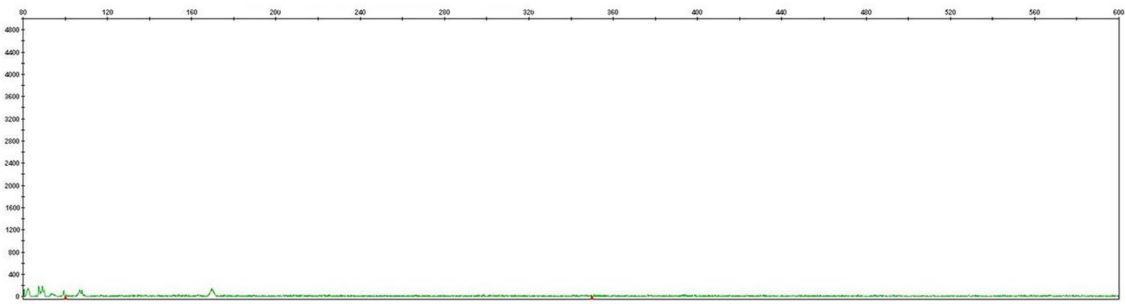
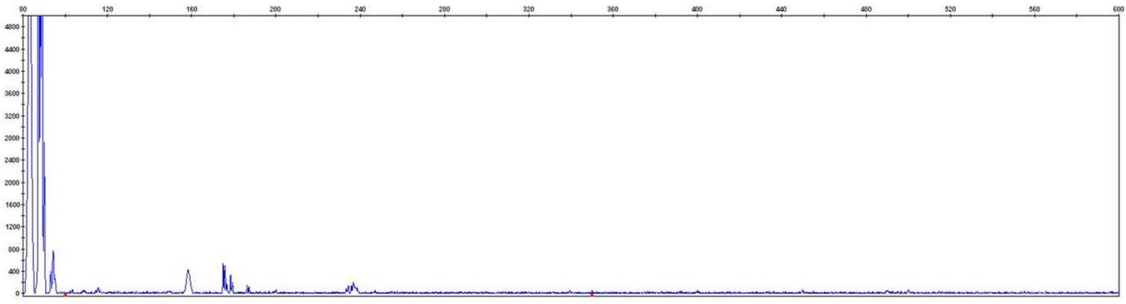
Caso 1 - material proveniente de bloco parafinado e fixado em formol



Caso 2 - material proveniente de pele congelada

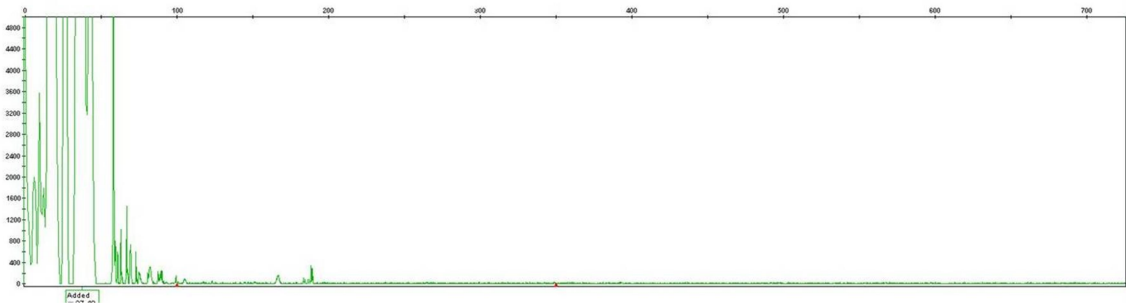
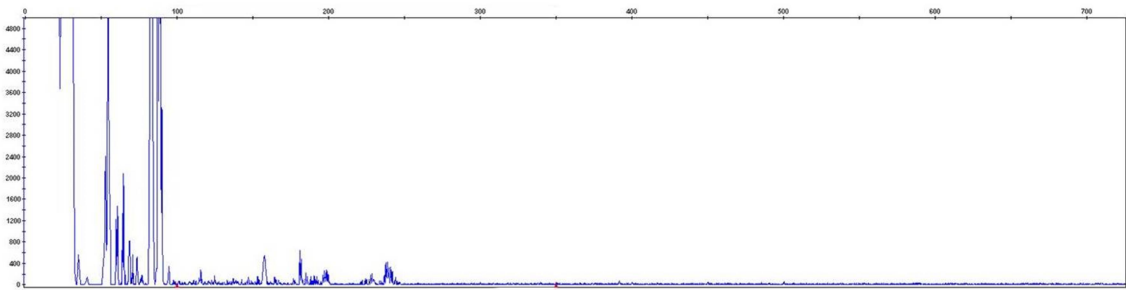


Caso 3 - material proveniente de bloco parafinado e fixado em formol

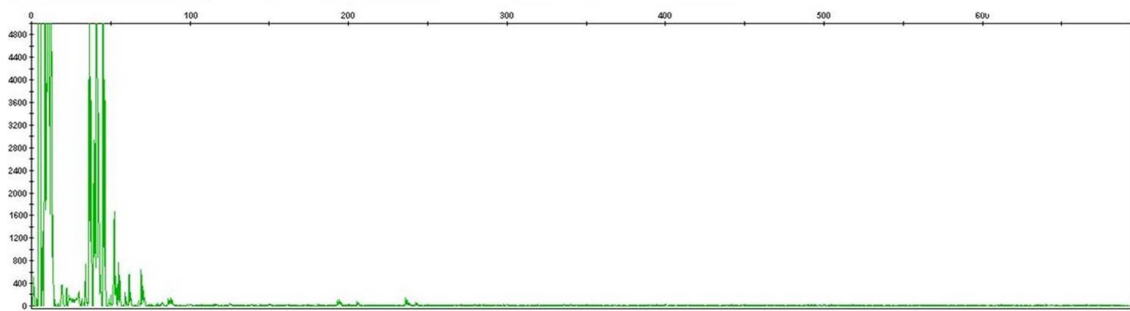
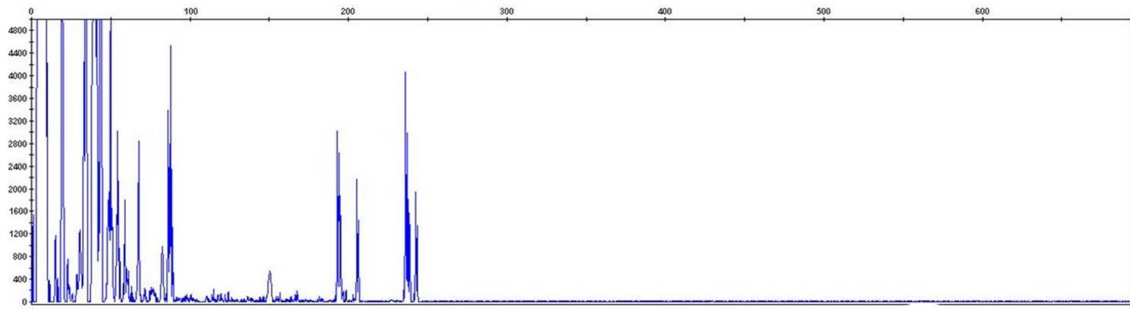


Não houve amplificação

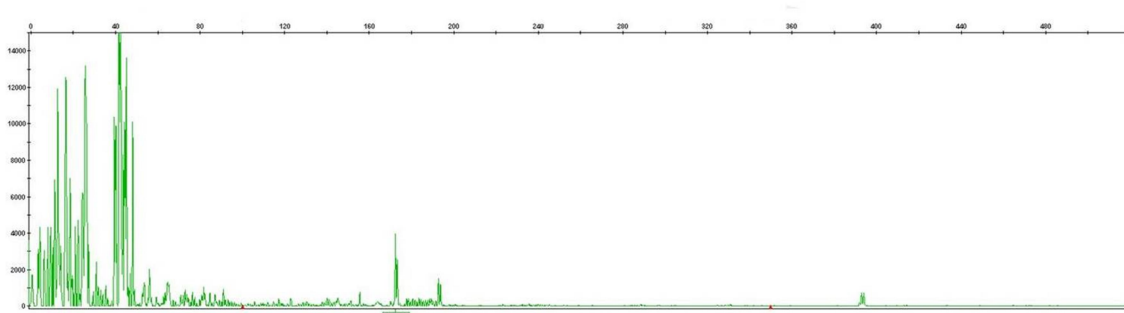
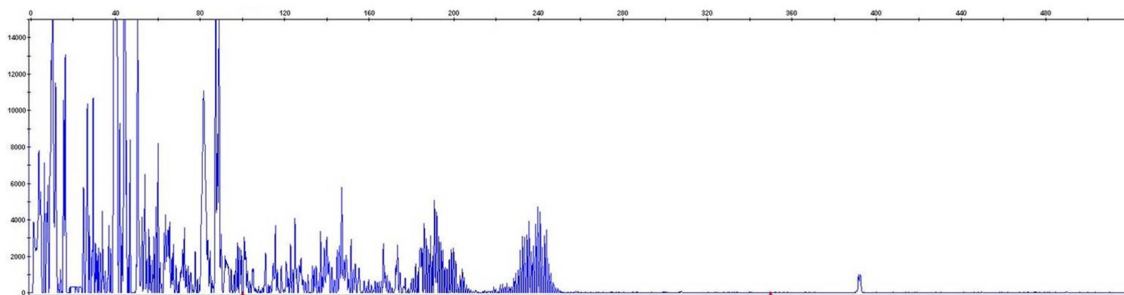
Caso 4 - material proveniente de bloco parafinado e fixado em formol



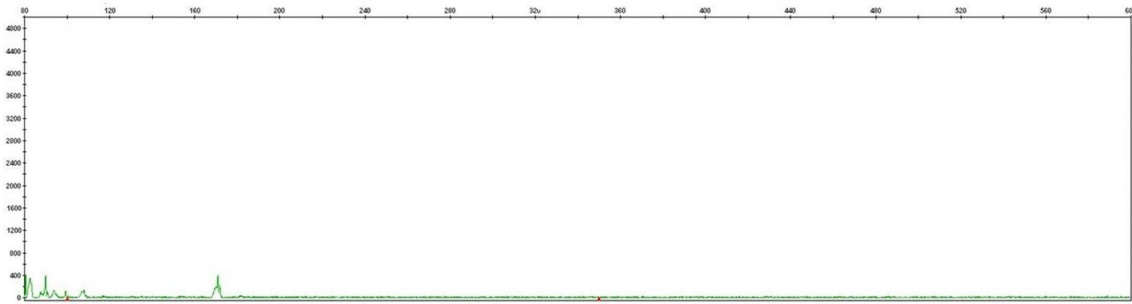
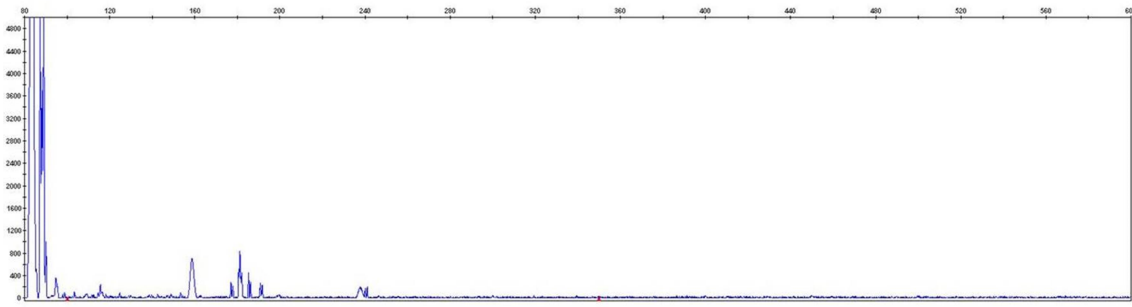
Caso 5 - material proveniente de bloco parafinado e fixado em formol



Caso 6 - material proveniente de pele congelada

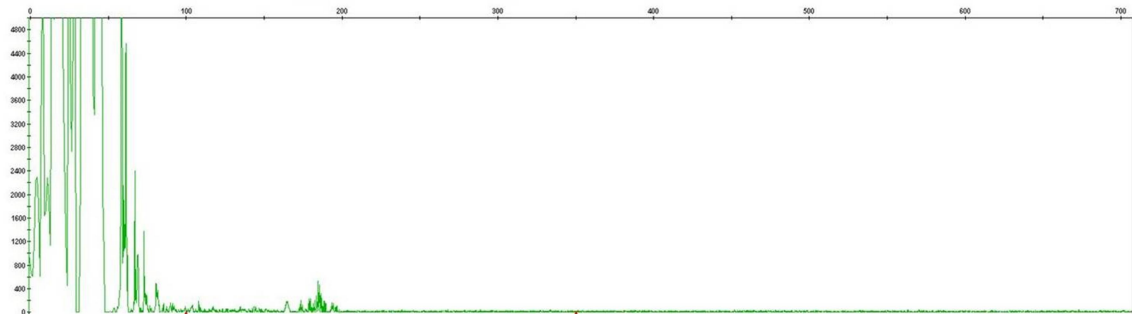
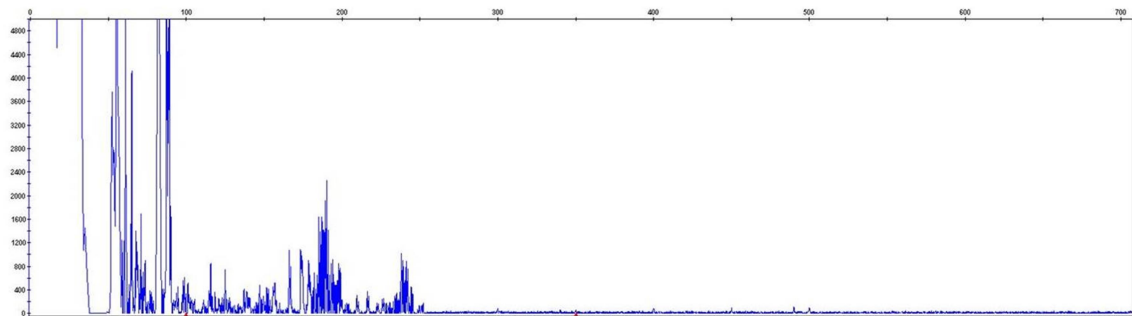


Caso 8 - material proveniente de bloco parafinado e fixado em formol

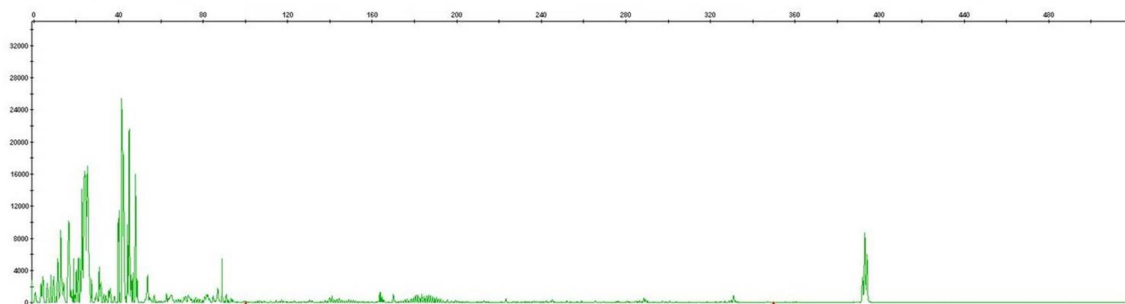
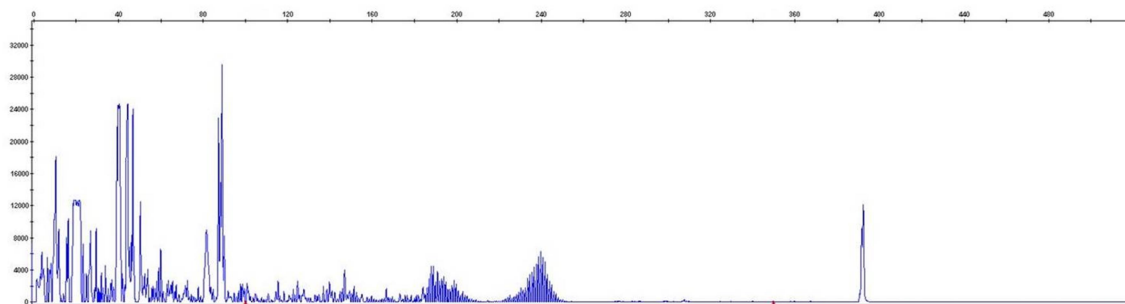


Não houve amplificação

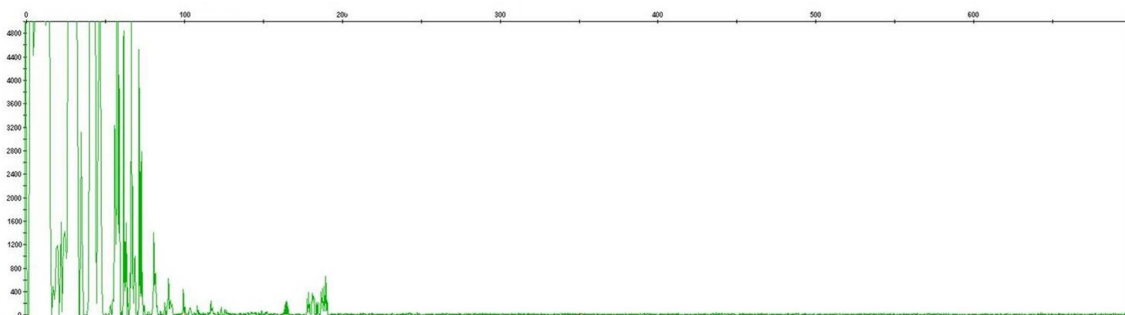
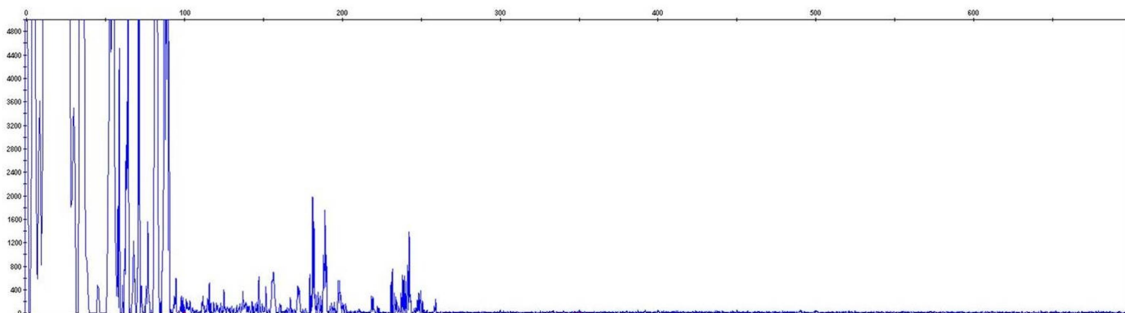
Caso 9 - material proveniente de bloco parafinado e fixado em formol



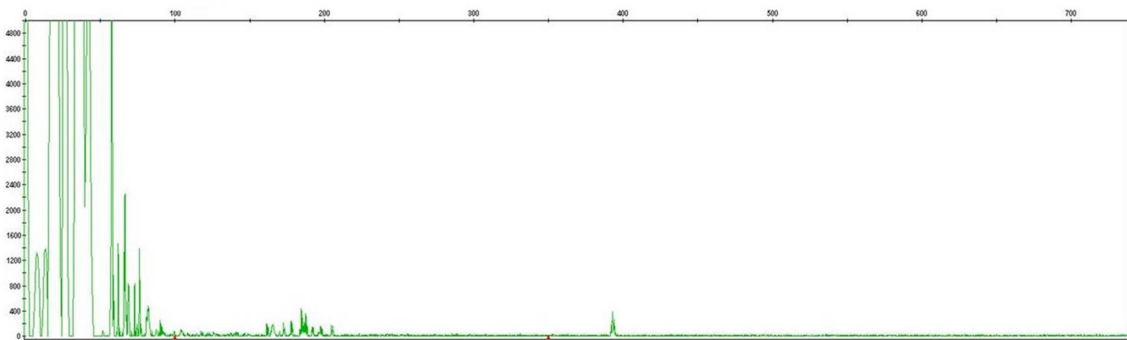
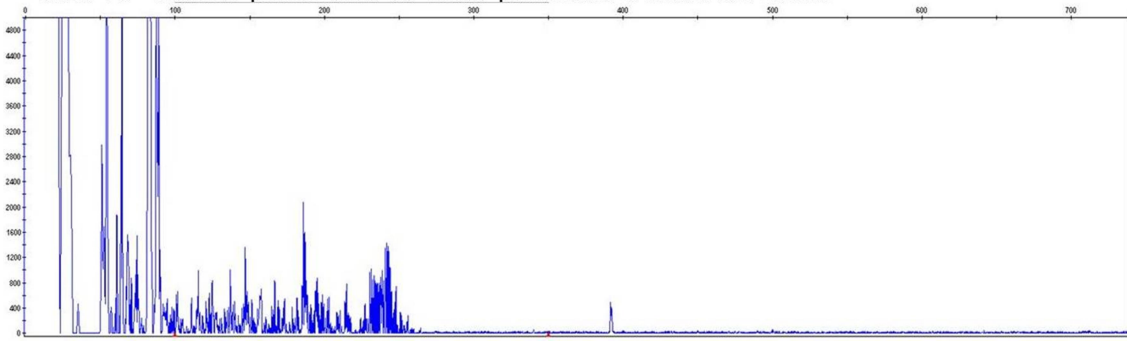
Caso 9 - material proveniente de pele congelada



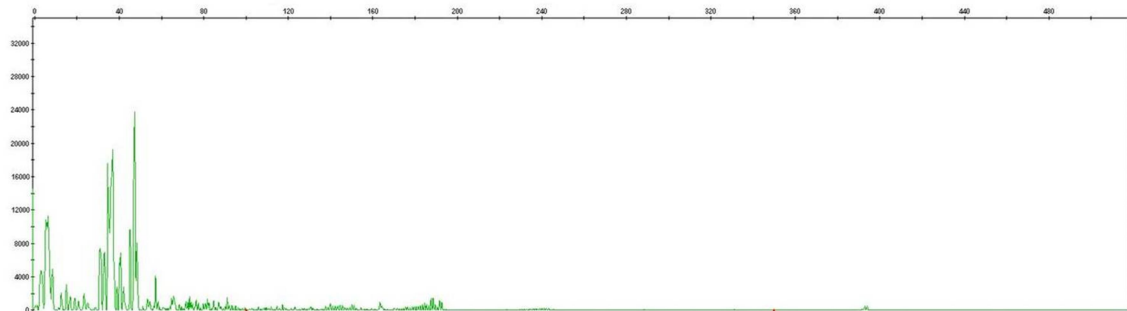
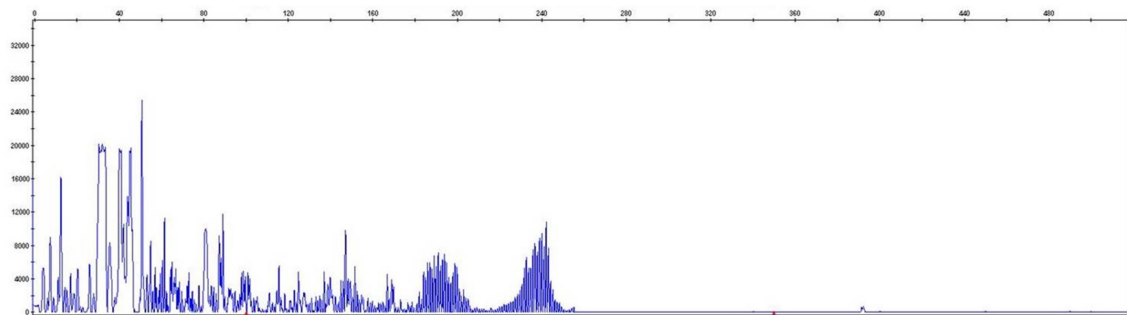
Caso 10 - material proveniente de bloco parafinado e fixado em formol



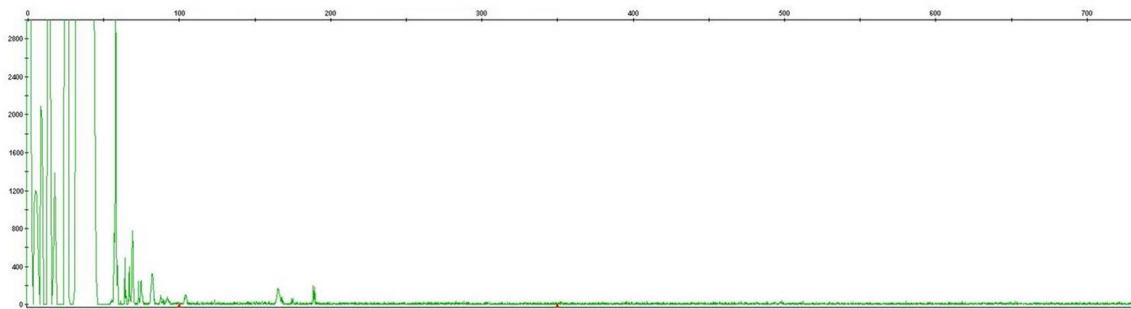
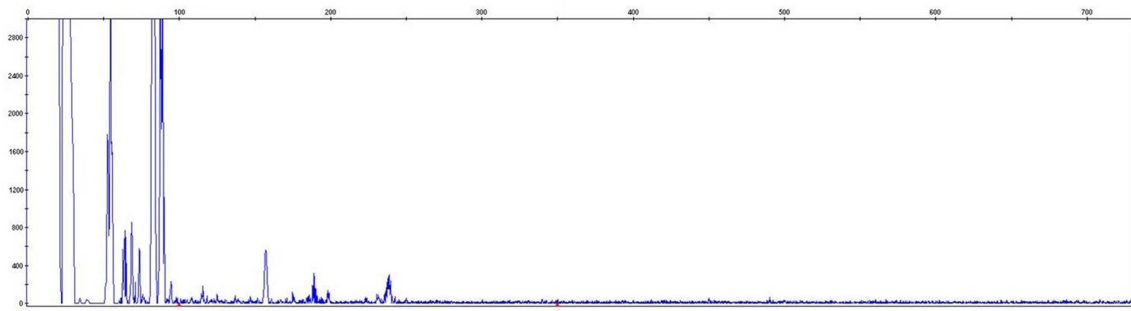
Caso 13 - material proveniente de bloco parafinado e fixado em formol



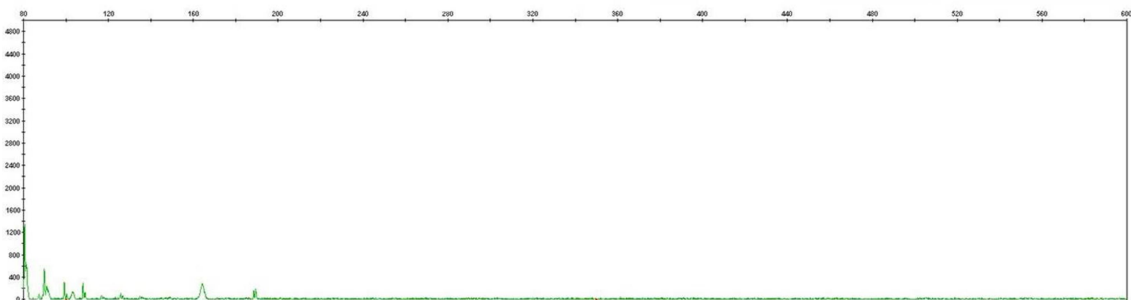
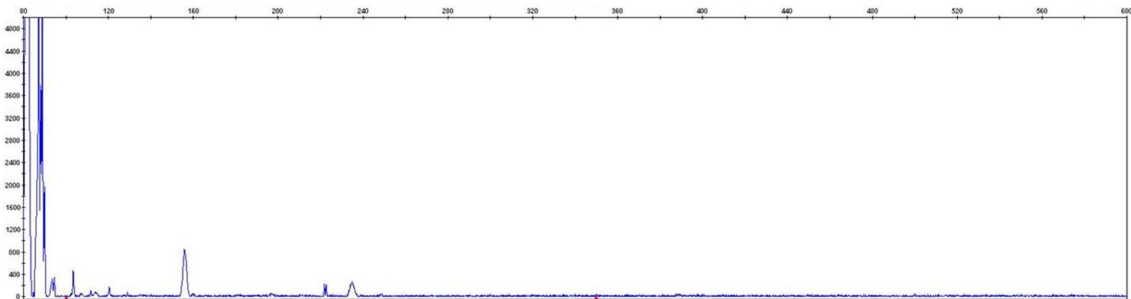
Caso 13 - material proveniente de pele congelada



Caso 14 - material proveniente de bloco parafinado e fixado em formol

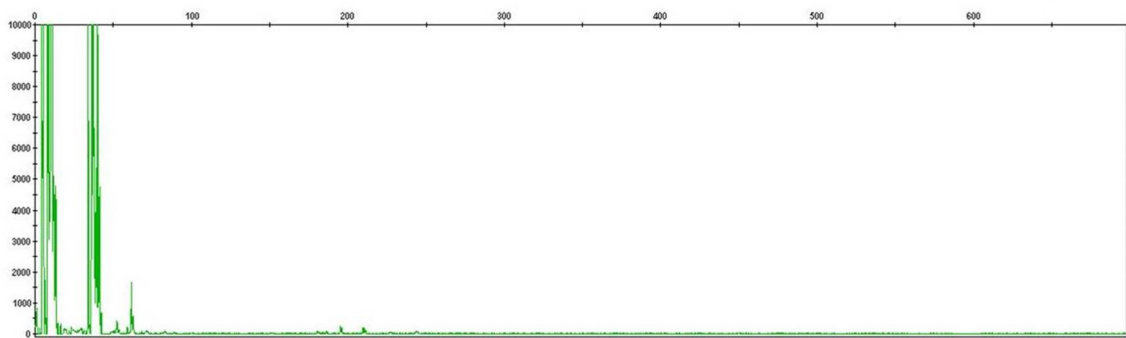
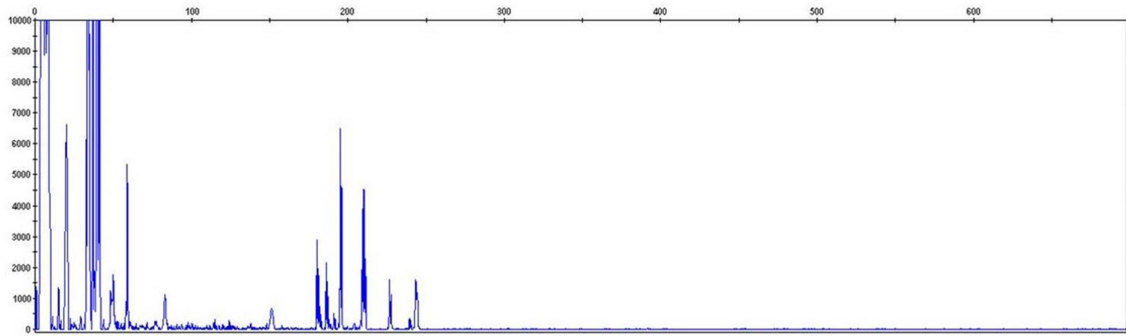


Caso 16 - material proveniente de bloco parafinado e fixado em formol

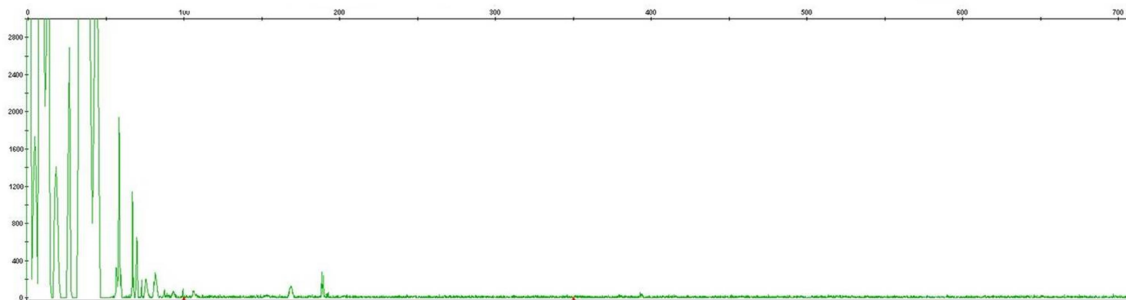
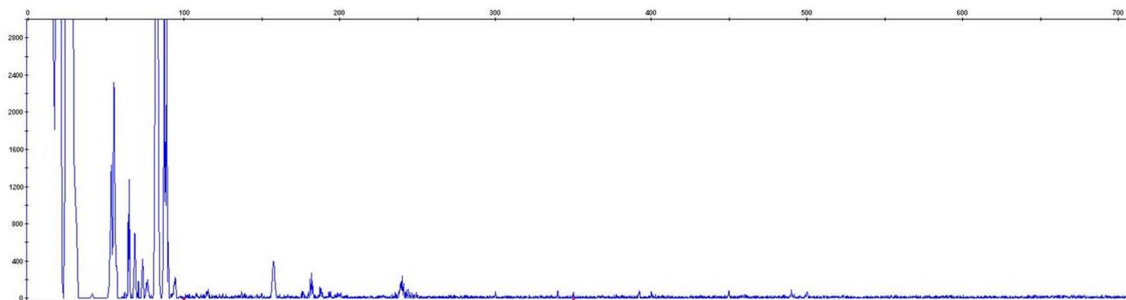


Não houve amplificação

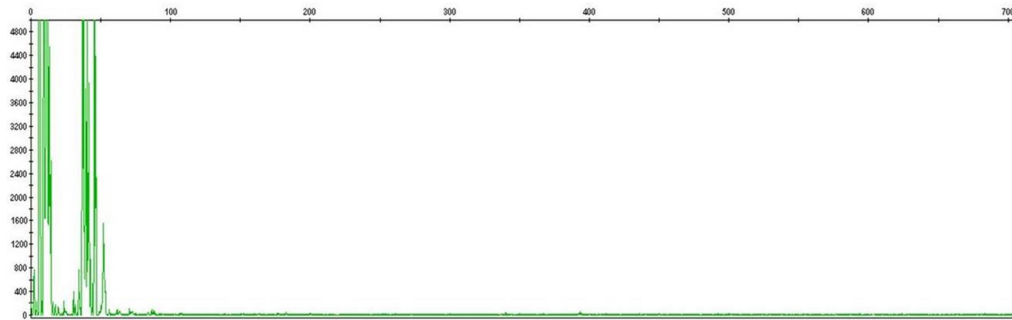
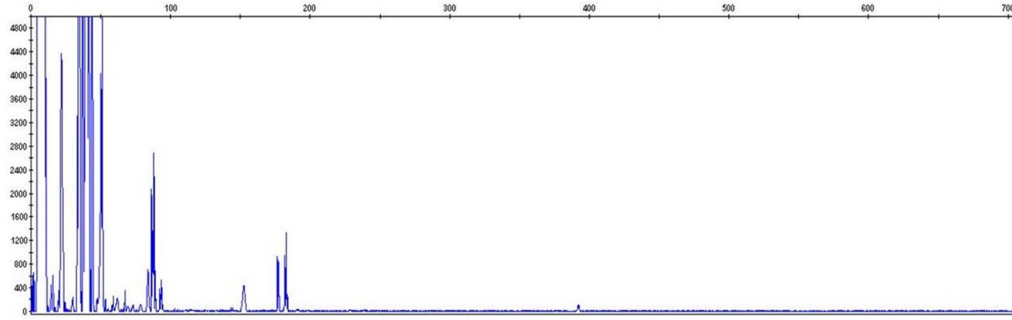
Caso 17 - material proveniente de bloco parafinado e fixado em formol



Caso 18 - material proveniente de bloco parafinado e fixado em formol

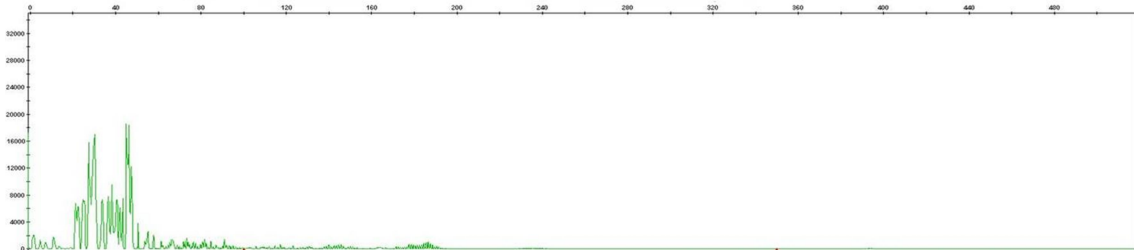
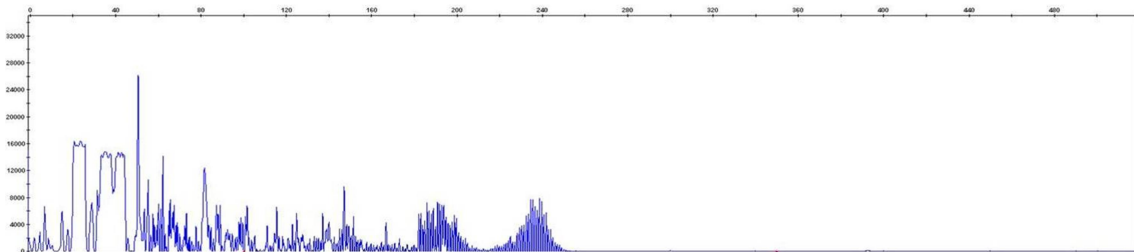


Caso 19 - material proveniente de bloco parafinado e fixado em formol

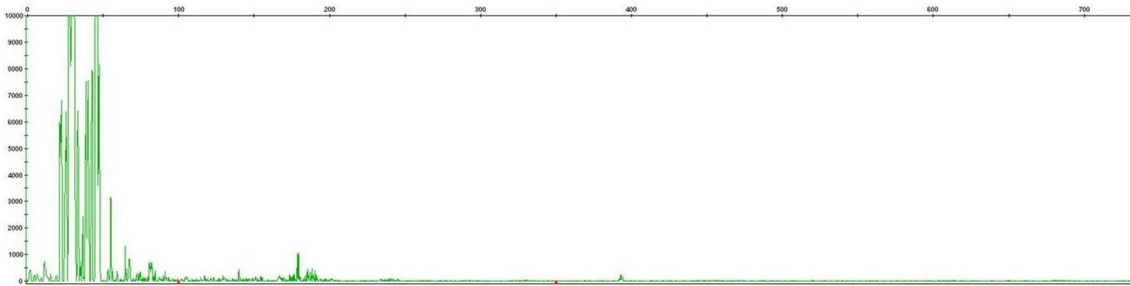
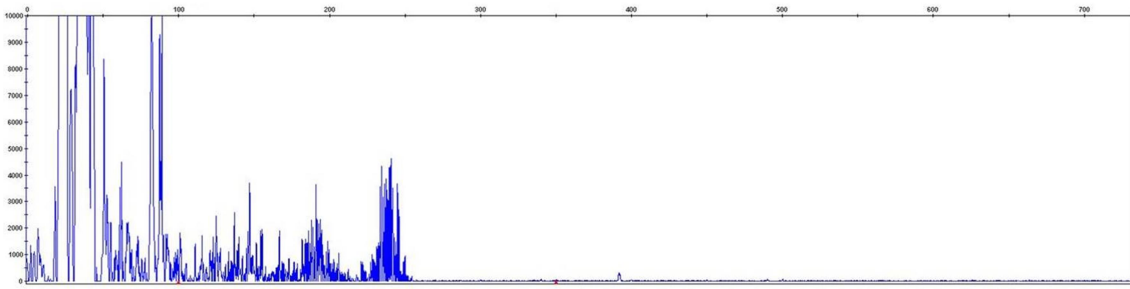


Não houve amplificação

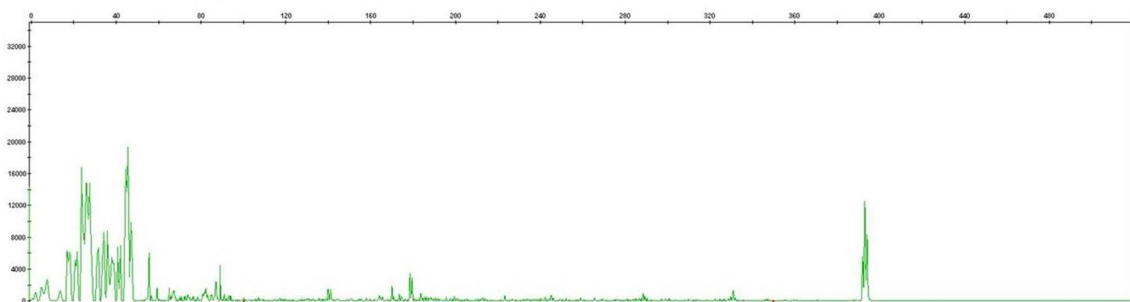
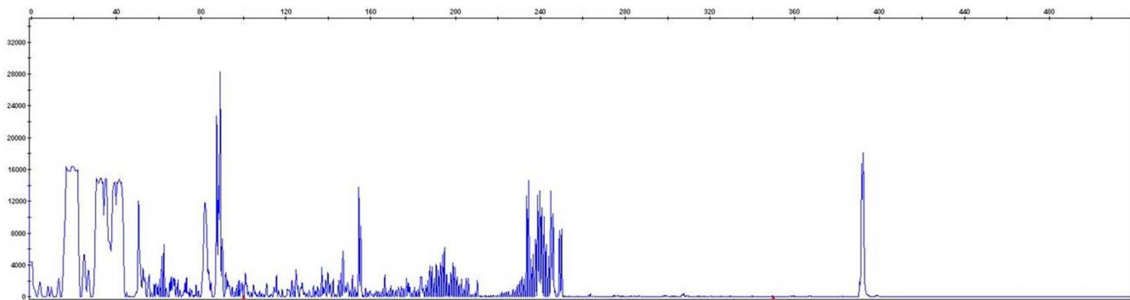
Caso 20 - - material proveniente de pele congelada



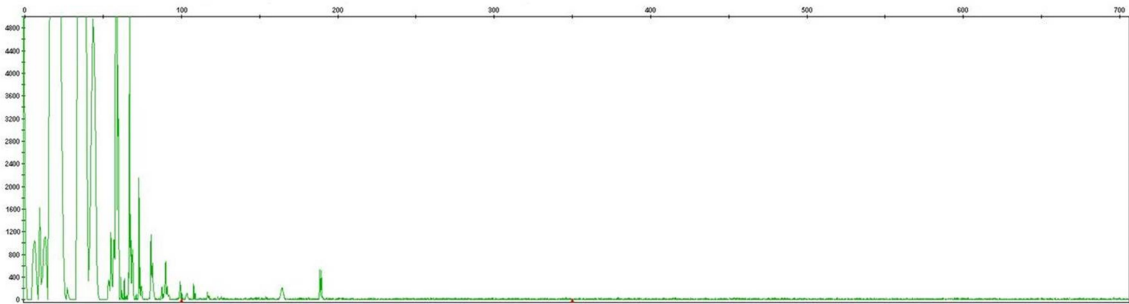
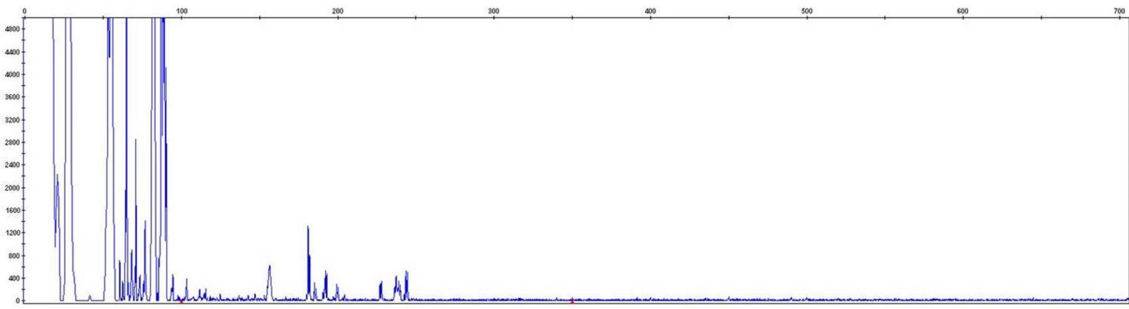
Caso 21 - material proveniente de bloco parafinado e fixado em formol



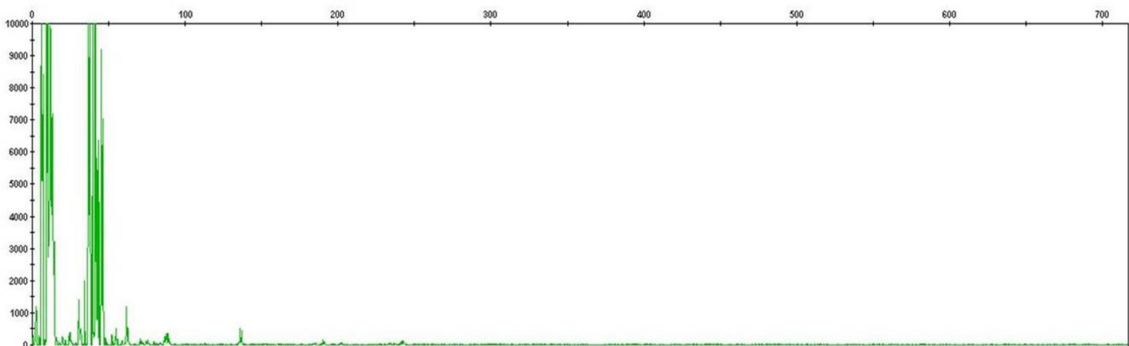
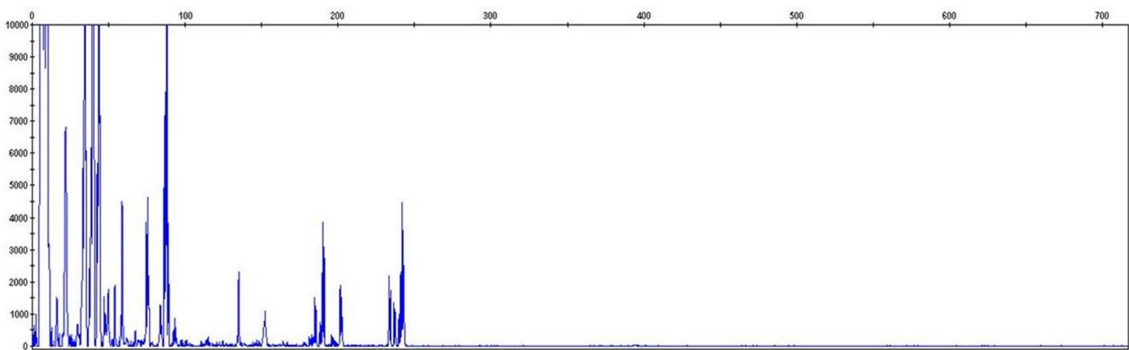
Caso 21 - material proveniente de pele congelada



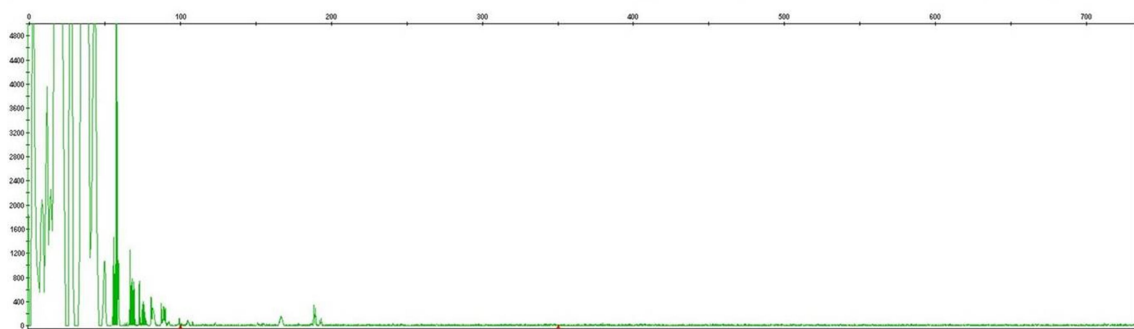
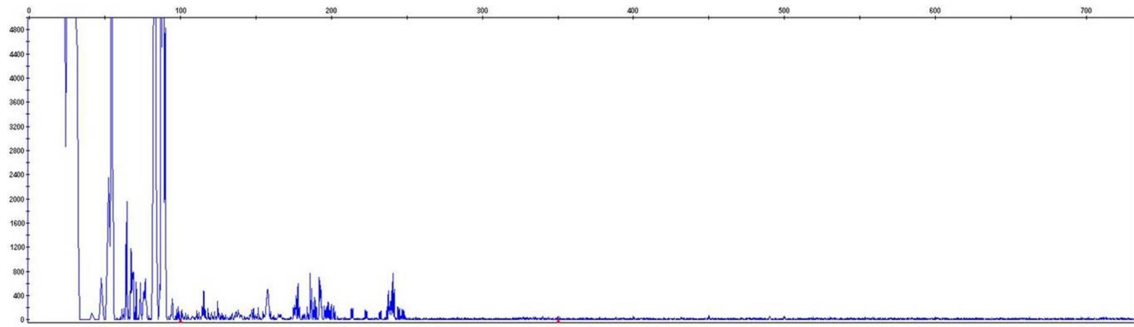
Caso 22 - material proveniente de bloco parafinado e fixado em formol



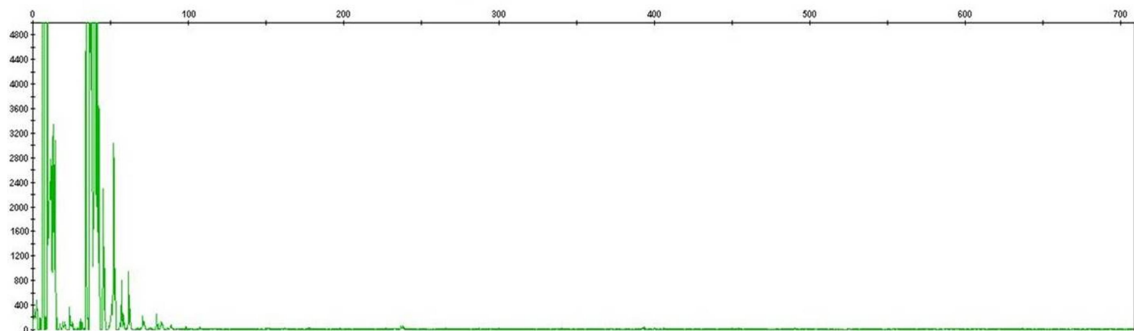
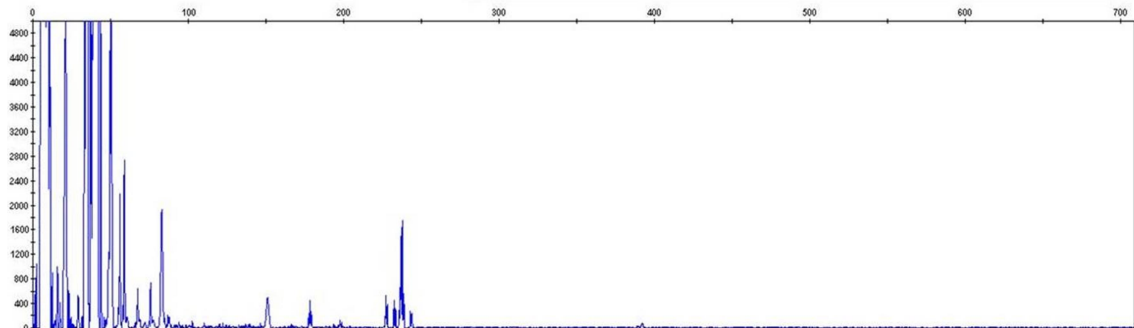
Caso 23 - material proveniente de bloco parafinado e fixado em formol



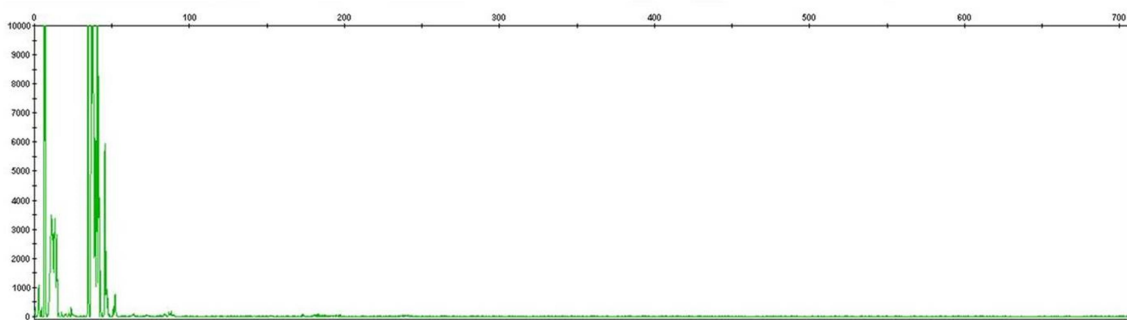
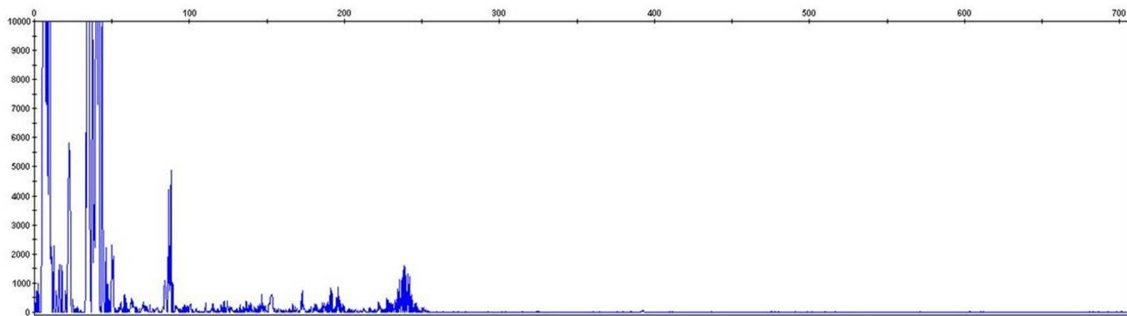
Caso 24 - material proveniente de bloco parafinado e fixado em formol



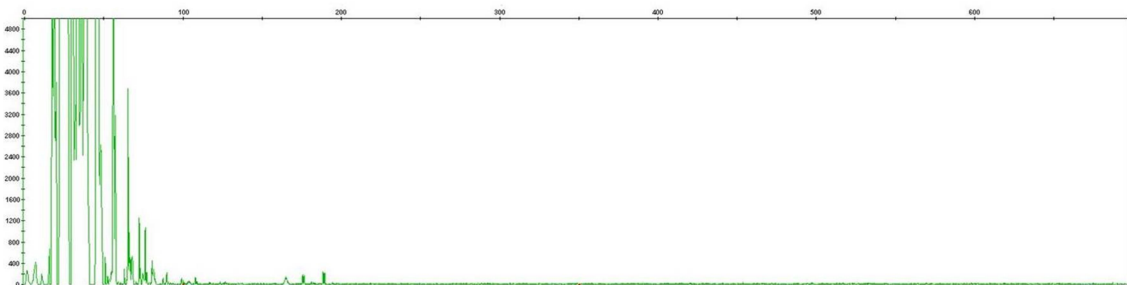
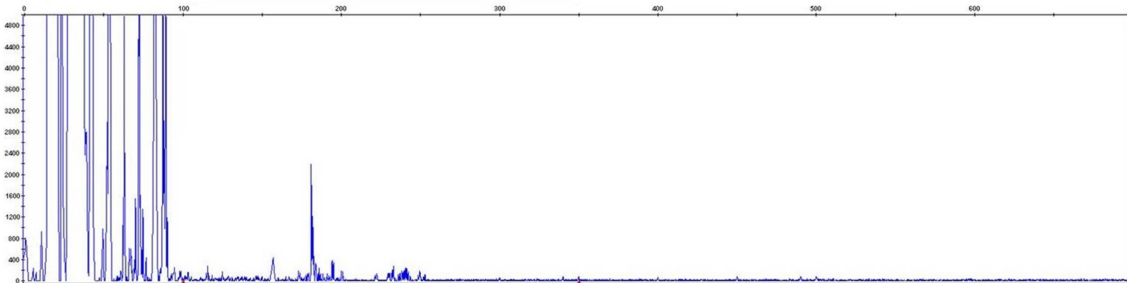
Caso 25 - material proveniente de bloco parafinado e fixado em formol



Caso 26 - material proveniente de bloco parafinado e fixado em formol

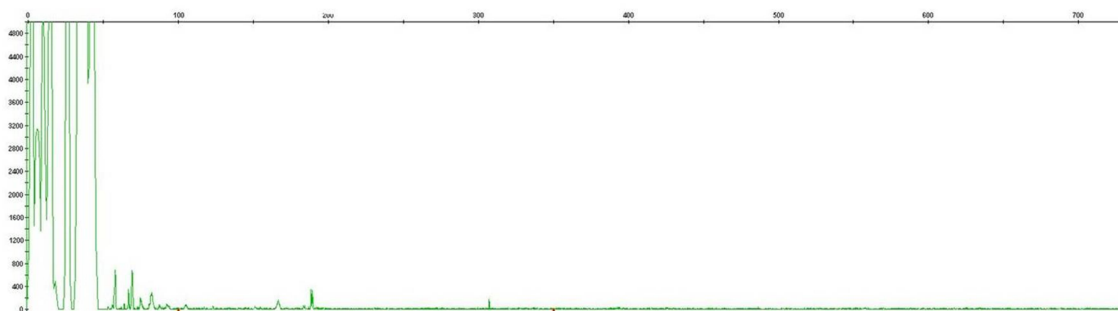
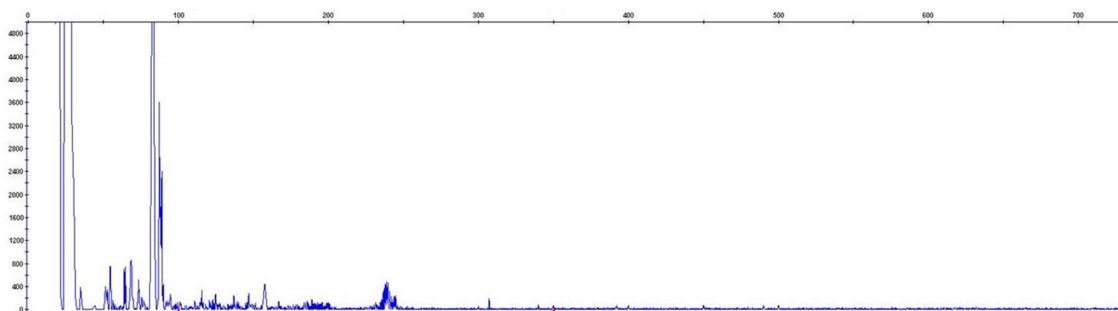


Caso 27 - material proveniente de bloco parafinado e fixado em formol

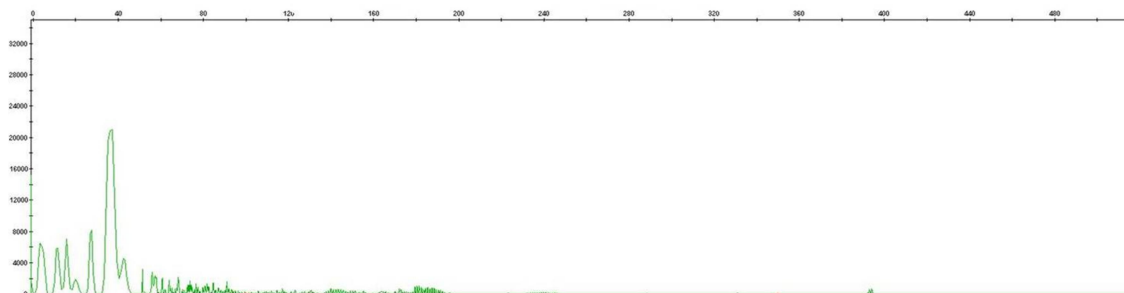
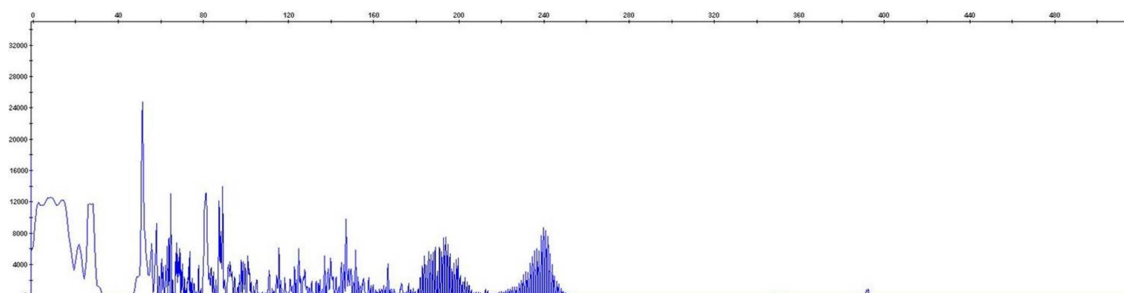


Não houve amplificação

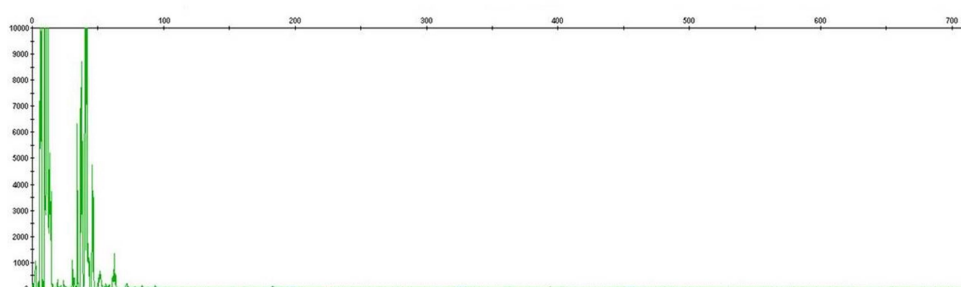
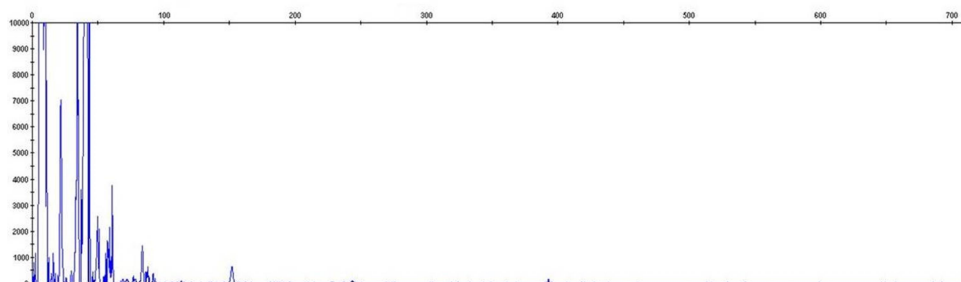
Caso 28 - material proveniente de bloco parafinado e fixado em formol



Caso 28 - material proveniente de pele congelada

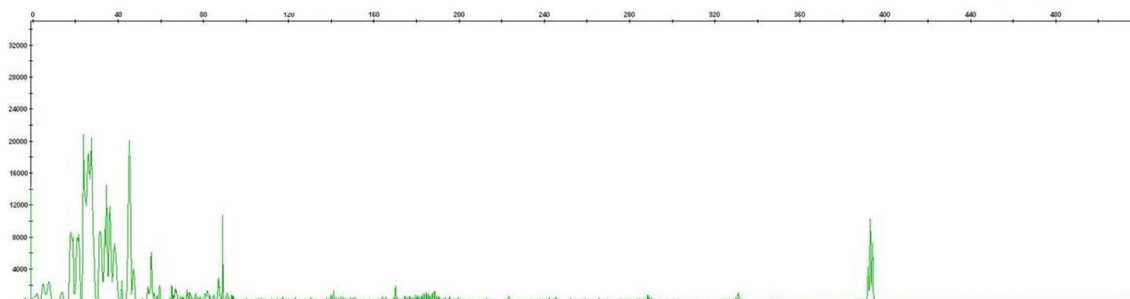
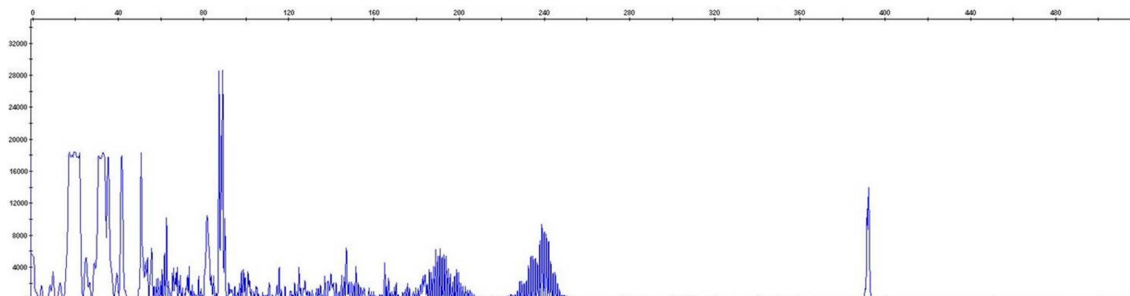


Caso 29 - material proveniente de bloco parafinado e fixado em formol

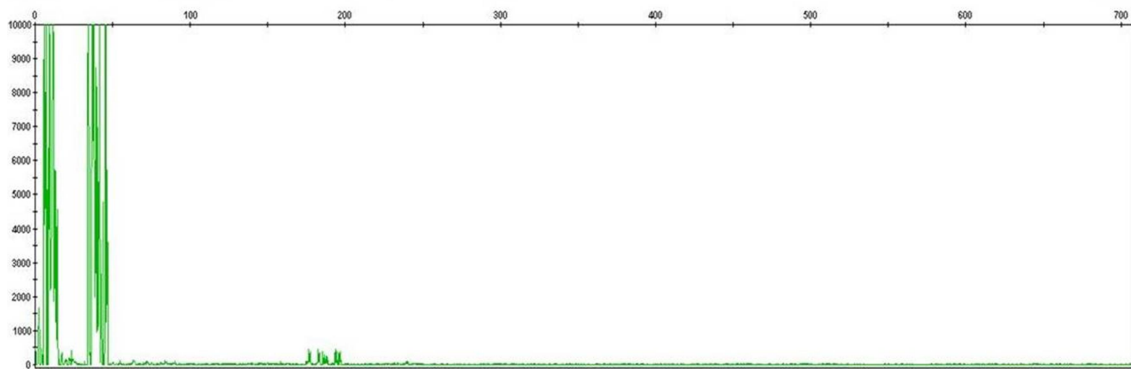
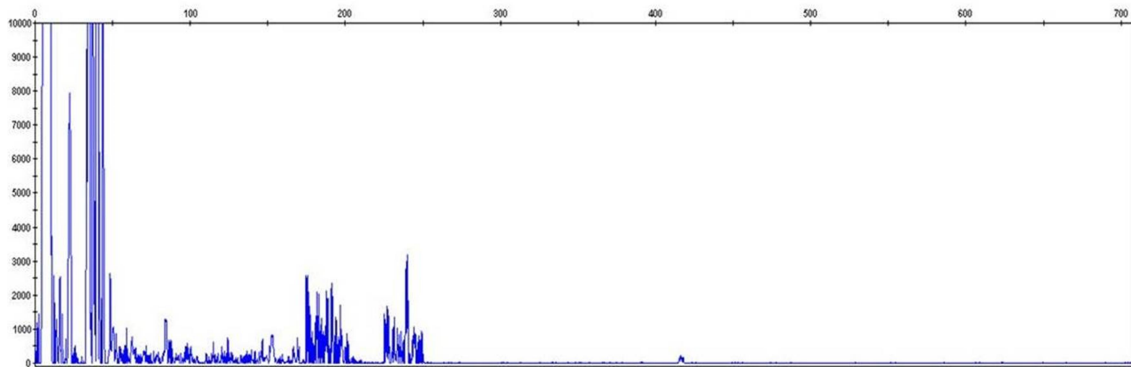


Não houve amplificação

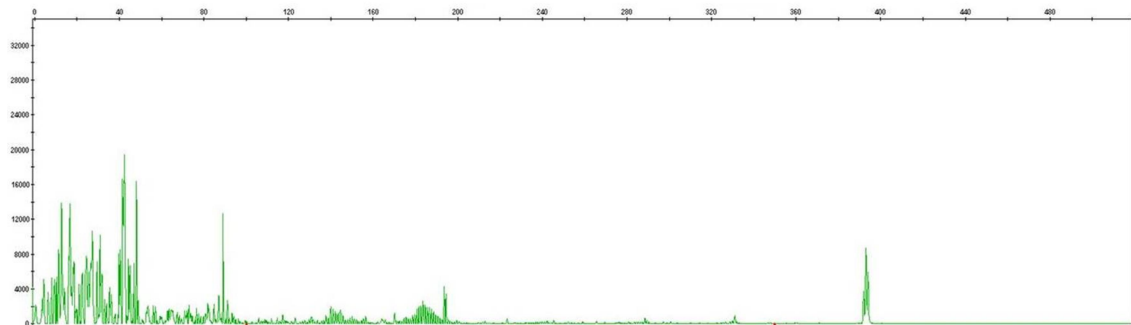
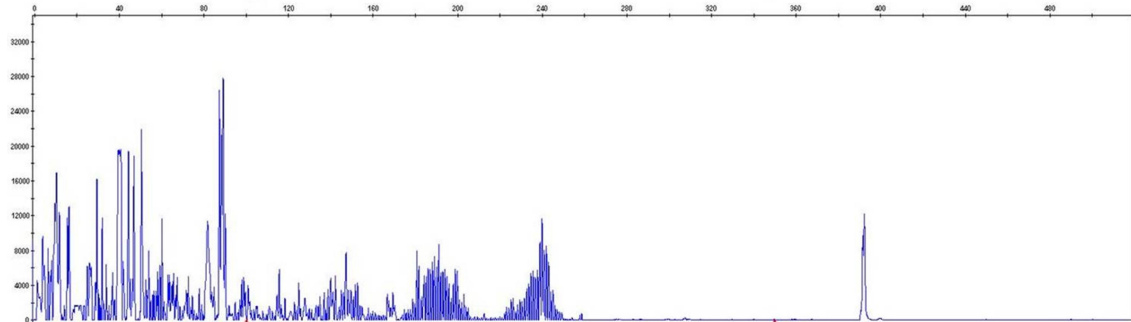
Caso 29 - material proveniente de pele congelada



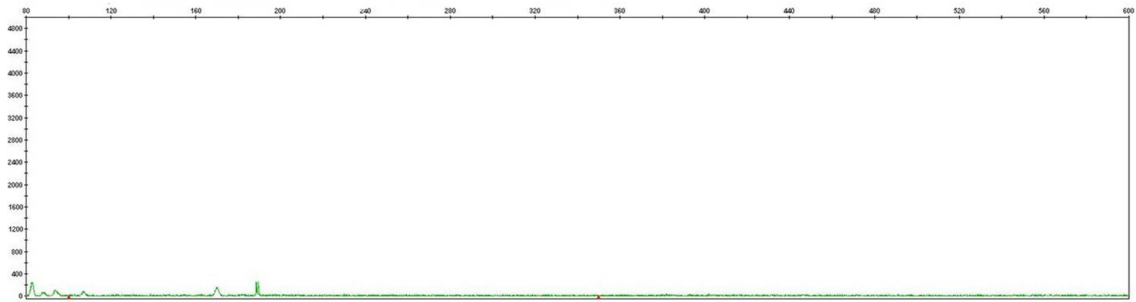
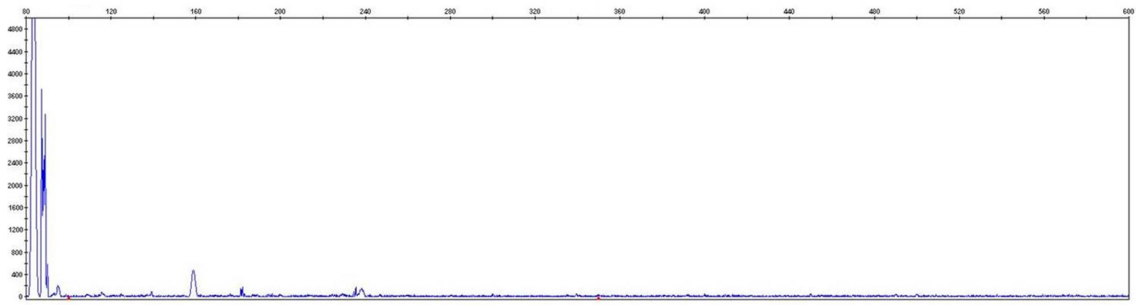
Caso 30 - material proveniente de bloco parafinado e fixado em formol



Caso 30 - material proveniente de pele congelada

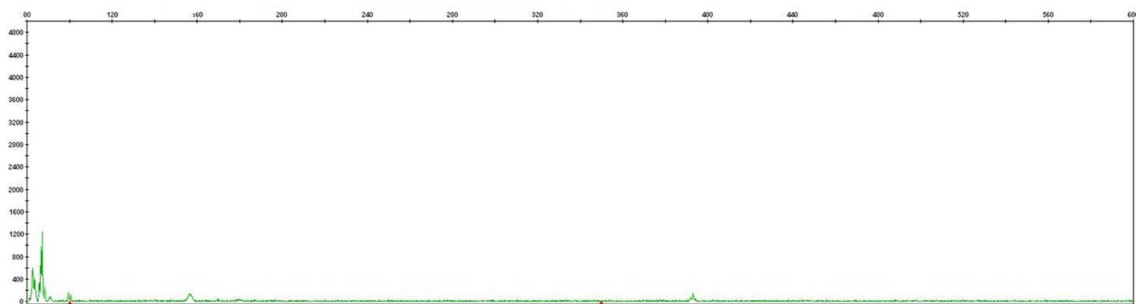
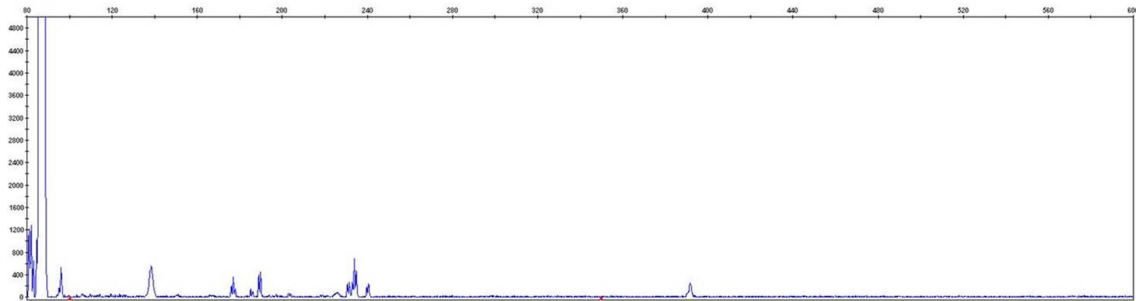


Caso 31 - material proveniente de bloco parafinado e fixado em formol



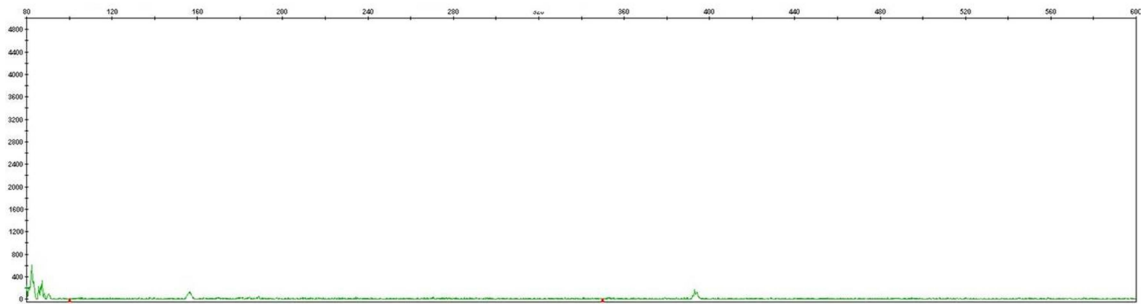
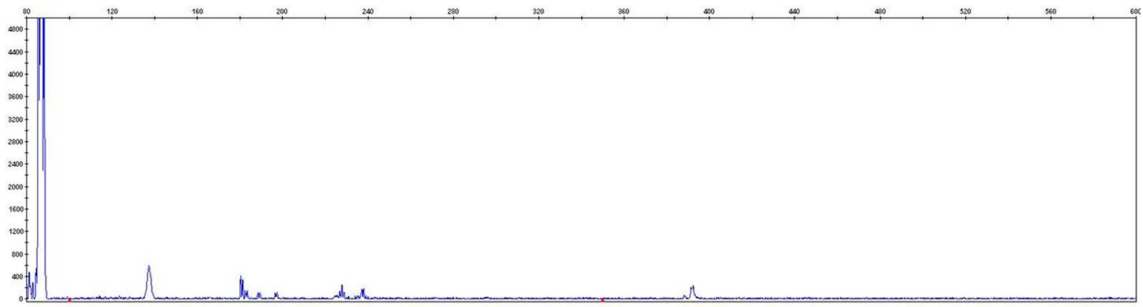
Não houve amplificação

Caso 32 - material proveniente de bloco parafinado e fixado em formol



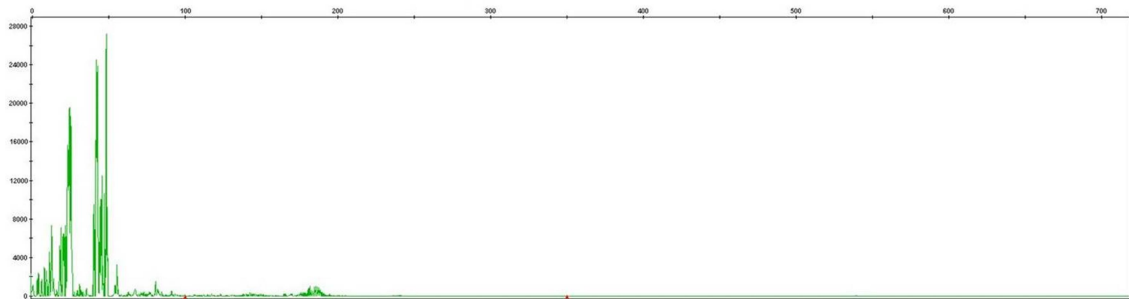
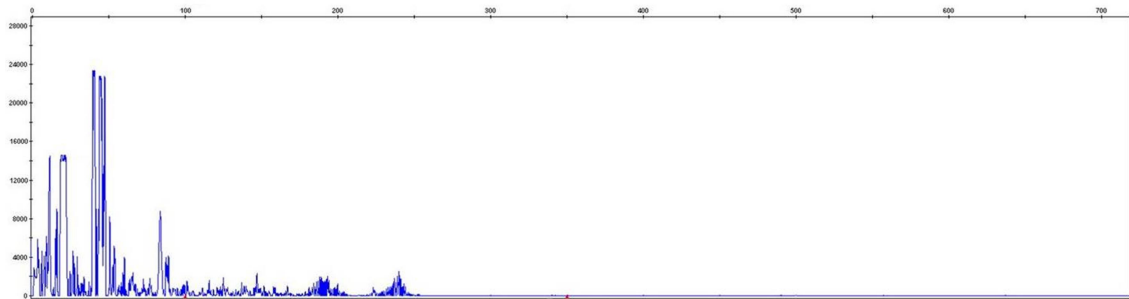
Não houve amplificação

Caso 33 - material proveniente de bloco parafinado e fixado em formol

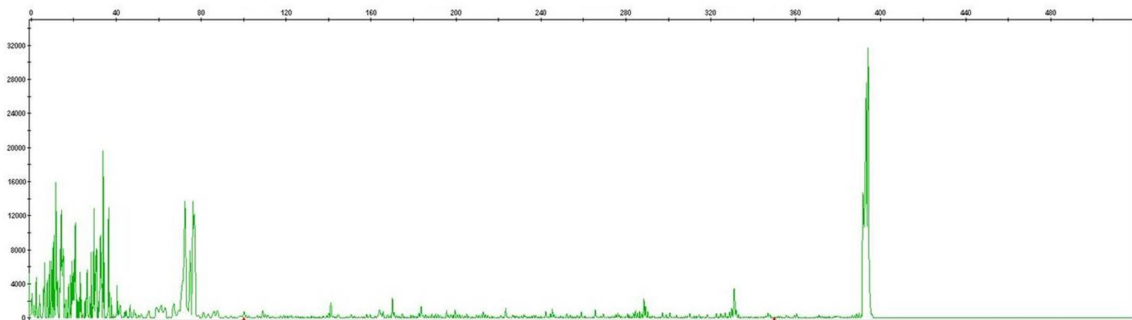
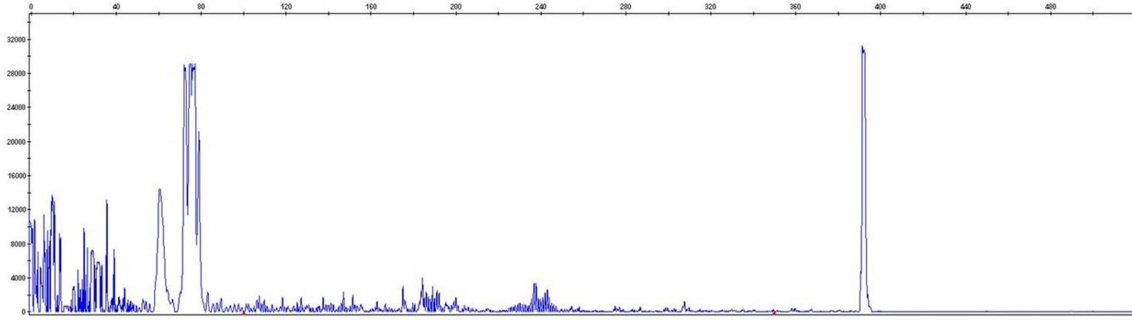


Não houve amplificação

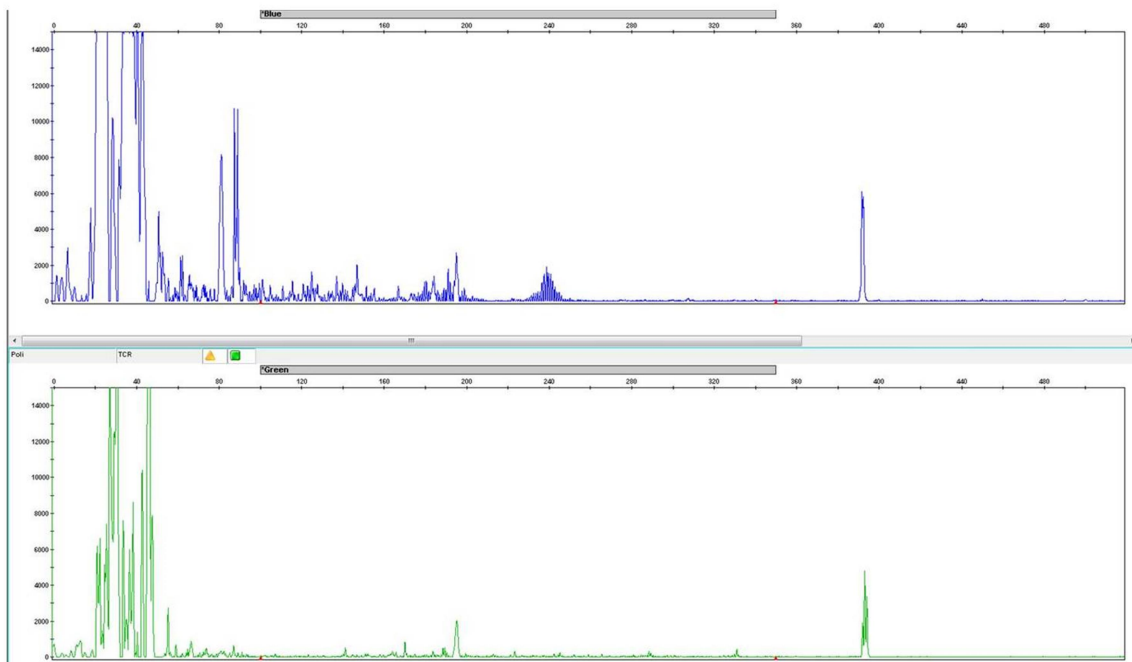
Caso 34 - material proveniente de bloco parafinado e fixado em formol



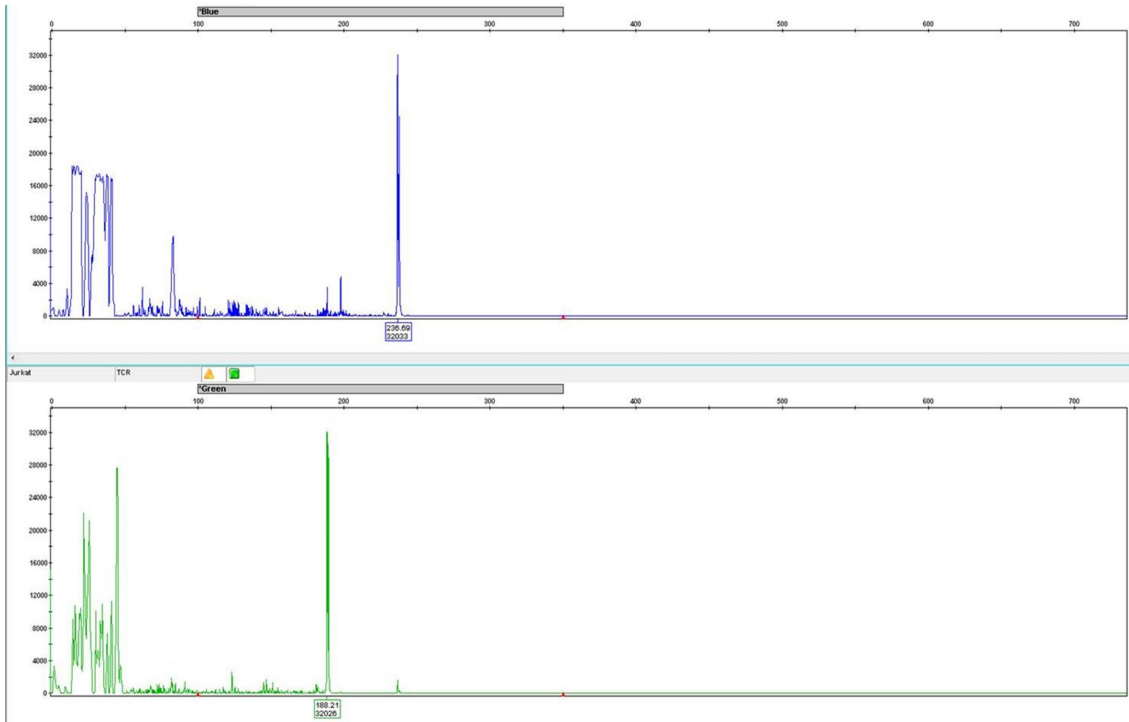
Caso 35 - material proveniente de pele congelada



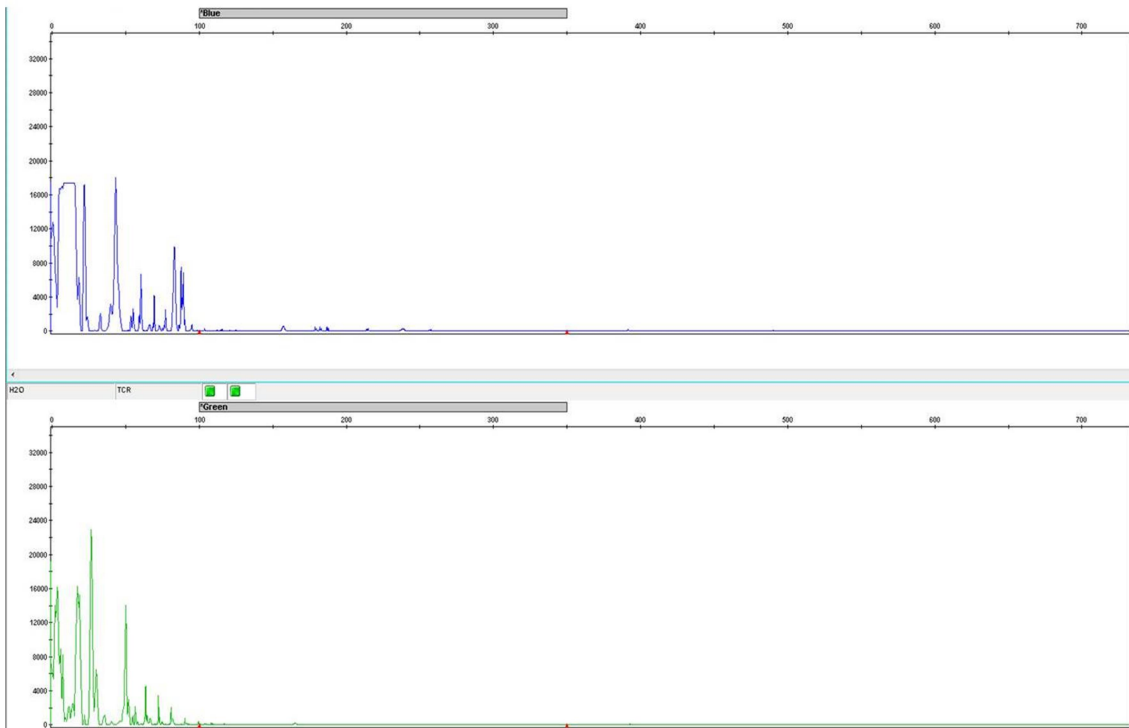
Controle policlonal



Controle monoclonal



Controle água



ANEXOS

ANEXO A - Tabela original de interpretação de PCR multiplex de análise do rearranjo de imunoglobulina

Recommended Positive Controls

Master Mix	Target	Color	Control DNA	Catalog #	Product Size in Basepairs
<i>IGH</i> Tube A	FR1-JH	Blue	Valid Size Range IVS-0030 Clonal Control DNA	--- 4-088-1750	310-360 280 ¹ , 326
<i>IGH</i> Tube B	FR2-JH	Blue	Valid Size Range IVS-0030 Clonal Control DNA	--- 4-088-1750	250-295 260
<i>IGH</i> Tube C	FR3-JH	Green	Valid Size Range IVS-0019 Clonal Control DNA	--- 4-088-1090	100-170 145
<i>IGK</i> Tube A	Vκ-Jκ	Blue	Valid Size Range IVS-0007 Clonal Control DNA	--- 4-088-0370	120-160, 190-210, 260-300 143
<i>IGK</i> Tube B	Vκ-Kde + intron-Kde	Blue	Valid Size Range IVS-0007 Clonal Control DNA	--- 4-088-0370	210-250, 270-300, 350-390 274, 282
Specimen Control Size Ladder	Multiple Genes	Blue	Valid Size Range IVS-0000 Polyclonal Control DNA	--- 4-092-0010	84, 96, 200, 300, 400, 600 ² 84, 96, 200, 300, 400, 600

Note: The amplicon sizes listed above were determined using an ABI 3100 platform. Amplicon sizes seen on your specific CE instrument may differ 1-4bp from those listed above depending on the platform of detection (ABI) and the version of the analysis software used. Once identified, the amplicon size as determined on your specific platform will be consistent from run to run. This reproducibility is extremely useful when tracking MRD.

Note¹: A 280bp band may also be present and is a known amplicon that lies just outside the valid size range for *IGH* Tube A.

Note²: Because smaller PCR fragments are preferentially amplified, it is not unusual for the 600bp fragment to have a diminished signal or to be missing entirely.

FONTE: Invivoscribe Instructions for Use IgH + IgK B-Cell Clonality Assay, 2016.

Recommended Positive Controls

Master Mix	Target	Color	Control DNA	Catalog #	Product Size in Basepairs
IGL Tube	Vλ-Jλ	Blue	Valid Size Range IVS-0010 Clonal Control DNA	--- 4-088-0550	135-170 139
Specimen Control Size Ladder	Multiple Genes	Blue	Valid Size Range IVS-0000 Polyclonal Control DNA	--- 4-092-0010	84, 96, 200, 300, 400, 600 84, 96, 200, 300, 400, 600

Note: The amplicon sizes listed above were determined using an ABI 3100 platform. Amplicon sizes seen on your specific CE instrument may differ 1-4bp from those listed above depending on the platform of detection (ABI) and the version of the analysis software used. Once identified, the amplicon size as determined on your specific platform will be consistent from run to run. This reproducibility is extremely useful when tracking MRD.

FONTE: Invivoscribe Instructions for Use IgL Gene Clonality Assay, 2015.