

## PARTICULARITĂȚI MORFOLOGICE ȘI IMUNOHISTOCHIMICE ALE LIMFOAMELOR CUTANATE PRIMARE CU CELULE B – ALGORITM DIAGNOSTIC

### MORPHOLOGICAL AND IMMUNOHISTOCHEMICAL PARTICULARITIES OF PRIMARY CUTANEOUS B-CELL LYMPHOMA – DIAGNOSTIC ALGORITHM

ROSEMARIE HERBECK\*, D. BRÎNZEU\*\*, ALIS DEMA\*\*\*, ELENA LAZĂR\*\*\*,  
C. SOLOVAN\*\*\*\*, V. FEIER\*\*, HORTENSIA IONIȚĂ\*\*\*\*

Timișoara

#### Rezumat

**Introducere:** Limfoamele cutanate primare cu celule B (LCPCB) reprezintă un grup particular de limfoame extranodale, cu o incidență între 20% și 25% din totalul limfoamele primare cutanate. Clasificarea WHO-EORTC propusă în 2005 recunoaște trei entități principale al LCPCB: limfomul cutanat primar cu celule B de zonă marginală, limfomul cutanat primar centrofolicular și limfomul cutanat primar difuz cu celule B mari.

**Scop:** În această lucrare ne propunem reevaluare aspectelor histologice și imunofenotipice ale LCPCB în scopul sintetizării unui protocol util în diagnosticul morfopatologic.

**Materiale și metode:** S-au revizuit aspectele histologice și imunohistochimice ale cazurilor de limfoame cutanate primare cu celule B diagnosticate în Departamentul de Patologie al Universității Johann Wolfgang Goethe, Frankfurt/Main, Germania pe o perioadă de 3 ani.

**Rezultate:** Histologic limfomul cutanat primar cu celule B de zonă marginală se prezintă sub forma unui infiltrat tumoral care interesează dermul și este dispus difuz sau nodular și constituit din limfocite de talie mică sau medie. Imunohistochimic celulele tumorale sunt

#### Summary

**Introduction:** Primary cutaneous B-cell lymphomas (CBCL) represent a unique group of extra-nodal lymphomas, ranging between 20% and 25% among primary cutaneous lymphomas. The WHO-EORTC classification for cutaneous lymphomas, published in 2005, includes three main entities of primary cutaneous B-cell lymphomas (CBCL): primary cutaneous B-cell lymphoma with marginal zone (pcMZL), primary cutaneous follicle centre lymphoma (pcFCL) and diffuse primary cutaneous large B-cell lymphoma, leg type (pcDLBCL).

**Aim:** To review the histological and phenol-typical features of the main entities of CBCL and to provide a diagnostic guideline for pathologists and dermatopathologists.

**Materials and methods:** Histological review was performed on hematoxylin-eosin and immunohistochemical stained sections from CBCL cases retrieved from the files of the Pathology Department of the University of Frankfurt/Main, Germany, over a period of 3 years.

**Results:** Histological, pcMZL is characterized by a nodular or diffuse infiltrate composed of small to medium-size lymphoid cells with indented nuclei and an abundant,

DermatoVenerol. (Buc.), 55: 89-102

\* Departamentul de Anatomie Patologică, Spitalul Clinic Județean de Urgență Timișoara.

\*\* Disciplina de Dermatologie, Universitatea de Medicină și Farmacie „Victor Babeș” Timișoara.

\*\*\* Disciplina de Anatomie Patologică, Universitatea de Medicină și Farmacie „Victor Babeș” Timișoara.

\*\*\*\* Disciplina de Hematologie, Universitatea de Medicină și Farmacie „Victor Babeș” Timișoara.

CD19+, CD20+, CD79a+, CD5-, CD10-, BCL-6- și BCL-2+. Limfomul cutanat primar centrofolicular este caracterizat histologic printr-un infiltrat nodular sau difuz alcătuit din celule relative monomorfe. Celule tumorale exprimă CD19, CD20, CD79a, BCL-6 și variabil CD10 și sunt negative pentru BCL-2. Microscopic limfomul cutanat primar difuz cu celule B mari se prezintă sub forma unui infiltrat difuz compus din limfocite B de talie medie sau mare asemănătoare centroblaștilor și / sau immunoblaștilor care imunohistochimic sunt CD20+, CD79a+, BCL-6+, BCL-2+, MUM1+, CD5- și CD10-.

**Concluzie:** LCPCB constituie un grup eterogen de limfoame cu celule B, a căror încadrare poate fi realizată numai după o sinteză completă a caracteristicilor clinice, histopatologice și imunofenotipice.

**Cuvinte cheie:** Limfoame cutanate cu celule B, imunohistochimie, algoritm diagnostic.

pale cytoplasm. They are immunohistochemical CD19+, CD20+, CD79a+, CD5-, CD10-, bcl-6- and bcl-2+. PcFCL is histological characterized by a nodular or diffuse infiltrate represented by a relatively mono-morph cellular admixture of centrocytes and centre-blasts. The tumor cells express CD19, CD20, CD79a, bcl-6 and variably CD10 by negativity for bcl-2. The microscopic aspect of PcDLBCL is a dense diffuse infiltrate, composed of centre-blasts and/or immune-blasts with large nuclei, prominent nucleoli and a high mitotic activity. Immune-phenotype, the infiltrate is CD20+, CD79a+, bcl-6+, bcl-2+, MUM1+, CD5- and CD10-.

**Conclusion:** PcBCL are a heterogeneous group of B-cell lymphomas whose precise classification can be achieved only after a complete synthesis of clinical, histopathological and immune-phenotype features.

**Key words:** Primary cutaneous B cell lymphomas, immunohistochemistry, guideline diagnostic.

## Introducere

Limfoamele cutanate primare (LCP) fac parte din grupul de limfoame non-Hodgkin extra-nodale și sunt situate pe locul doi ca incidență, în urma celor localizate la nivelul tractului digestiv. Conform definiției, LCP se dezvoltă la nivelul tegumentului cu absența leziunilor extracutanate la momentul diagnosticului spre deosebire de limfoamele cutanate secundare care reprezintă determinări cutanate ale limfoamelor primare limfonodale sau ale leucemiilor diseminate.

LCP cuprind un spectru larg de neoplazii limfoproliferative, heterogene din punct de vedere clinic și histologic. În funcție de celule de origine, se disting limfoame cu celule T, celule NK sau celule B precum și alte malignități hematopoietice [1-3].

Limfoamele cutanate primare cu celule B (LCPCB) sunt mai puțin frecvente, cuprinzând aproximativ 20%-25% din totalul LCP [4]. După ani de confuzie privind terminologia și clasificarea acestora, Organizația Mondială a Sănătății – Organizația Europeană pentru Cercetare și Tratament al Cancerului (WHO/EORTC) propune în 2005 o clasificare care recunoaște trei entități principale: limfomul cutanat primar cu celule B de zonă marginală, limfomul cutanat primar centrofolicular și limfomul cutanat primar difuz cu celule B mari [5]. Recunoașterea acestora și diferențierea de limfoamele cutanate secundare prezintă o

## Introduction

Primary cutaneous lymphomas (LCP) are part of the group of non-Hodgkin's extra-nodal lymphoma and are ranked second in incidence, located behind the digestive tract ones. As defined, the LCP is developing in the skin with no extra-cutaneous lesions at the diagnosis time unlike the secondary cutaneous lymphomas which present cutaneous determinations of primary lymph-node lymphoma or disseminated leukemia.

LCP includes a wide spectrum of lymphoproliferative malignancies, heterogeneous from clinical and histological point of view. Depending on the cell of origin, one can distinguish T-cell lymphomas, NK cells or B cells and other hematopoietic malignancies [1-3].

Primary cutaneous B cell lymphomas (LCPCB) are uncommon, containing approximately 20–25% of LCP [4]. After years of confusion on terminology and classification, World Health Organization – European Organization for Research and Treatment of Cancer (WHO/EORTC) has proposed in 2005 a classification that acknowledges three main entities: primary cutaneous lymphoma with marginal zone B cells, primary cutaneous centrofollicular lymphoma and primary cutaneous diffuse large B cell lymphoma [5]. This classification and differentiation of secondary

deosebită importanță nu doar din punct de vedere clinic dar și din punct de vedere terapeutic și prognostic, fiind recunoscut faptul că limfomul cutanat primar cu celule B de zonă marginală și limfomul cutanat primar centrofolicular sunt leziuni indolente care beneficiază de o terapie mai puțin agresivă, diferită de cea a limfoamelor limfonodale [6]. În această lucrare ne propunem reevaluare aspectelor histologice și imunofenotipice ale LCPCB în scopul sintetizării unui protocol util în diagnosticul morfopatologic.

## Material și metodă

S-au revizuit cazurile de limfoame cutanate primare cu celule B diagnosticate în Departamentul de Patologie al Universității Johann Wolfgang Goethe, Frankfurt/Main, Germania pe o perioadă de 3 ani. În acest scop s-au reevaluat atât preparatele în colorație uzuală (hematoxilina-eozină) cât și cele marcate imuno-histochimic precum și datele actuale din literatura de specialitate.

### *Tehnica imunohistochimică*

Din blocuri de țesut incluse în parafină s-au efectuat secțiuni cu grosimea de 4 μm. Acestea au fost montate pe lame încărcate pozitiv și apoi deparafinate în 3 băi succesive de xilen, rehidratate în băi de alcool în concentrații descrescătoare (100%, 96%, 80%, 70%) și purificate în apă distilată. În scopul demascării situsurilor antigenice, secțiunile au fost supuse unui tratament termic prin fierbere în EDTA (pH 8) pentru 1 min, utilizând oala sub presiune. După răcire la temperatura camerei, secțiunile au fost incubate timp de 30 de minute cu anticorpii primari. Furnizorii anticorpilor și diluții utilizate sunt rezumate în tabelul I. În continuare, s-a aplicat protocolul sistemului de detecție Dako REAL, Alkaline Phosphatase/RED, Rabbit/mouse.

## Rezultate

Pe perioada evaluată s-au identificat un număr de 8 pacienți diagnosticați cu limfoame cutanate primare. Conform criteriilor de clasificare WHO-EORTC pentru limfoame cutanate, pacienții au fost încadrați în următoarele subtipuri de limfoame cutanate primare: limfom

cutaneous lymphomas have great importance not only clinically but also in terms of treatment and prognosis, being recognized that primary cutaneous marginal zone B cell lymphoma and primary cutaneous lesions centre-follicular lymphoma are indolent, receiving a less aggressive therapy, other than lymph-node lymphoma [6]. In this paper we propose to reassess the histological and immune-phenotype aspects of LCPCB and to synthesis a useful protocol in the morph-pathological diagnosis.

## Materials and methods

There were reviewed the cases of primary cutaneous B cell lymphoma diagnosed in the Pathology Department of the Johann Wolfgang Goethe University, Frankfurt / Main, Germany over 3 years period. To this aim there have been reassessed as usual coloring preparations (hematoxylin-eosine) and those marked as immunohistochemical and current data from literature.

### *Immunohistochemical technique*

Of tissue included in paraffin blocks were made 4 μm thick sections. They were mounted on positively charged blades and then dewaxed in 3 successive baths of xylene, rehydrated in alcohol baths with decreasing concentrations of (100%, 96%, 80%, 70%) and purified in distilled water. In order to uncover antigenic sites, sections were heat-treated by boiling in EDTA (pH 8) for 1 min, using the cooker pressure. After cooling to room temperature, sections were incubated for 30 minutes with primary antibodies. Antibody suppliers and dilutions used are summarized in Table I. Next, the Dako REAL detection system, Alkaline Phosphatase / RED, Rabbit / mouse protocol was applied.

## Results

During evaluated period, there were identified a number of 8 patients diagnosed with primary cutaneous lymphomas. According to WHO-EORTC criteria classification for cutaneous lymphomas, patients were classified into the following subtypes of primary cutaneous lymphomas: Primary cutaneous B cell lymphoma

**Tabelul I. Date privind anticorpii utilizați în evaluarea imunohistochimică a LCPCB**

Denumirea	Clona	Compania producătoare	Diluția
CD20	L26	DAKO	1:200
CD79a	HM57	DAKO	1:200
CD10	56C6	Novocastra Laboratories	1:40
Bcl-6	PG-B6P	DAKO	1:25
Bcl-2	124	DAKO	1:50
MUM1	MUM-1P	DAKO	1:200
CD5	4C7	Novocastra Laboratories	1:10
Cyclina D1	P2D11F11	Novocastra Laboratories	1:10
CD3	PS1	Novocastra Laboratories	1:50

cutanat primar cu celule B de zonă marginală (n = 3; 37,5%), limfom cutanat primar centro-folicular (n = 3; 37,5%), limfom cutanat primar difuz cu celule B mari (n = 2; 25%). Caracteristicile imunohistochimice ale celulelor tumorale corespunzătoare fiecărui subtip de limfom cutanat primar cu celule B sunt sintetizate în tabelul II.

**Tabel I. Data on the antibodies used in immunohistochemistry assessment of LCPCB**

Name	Clone	The manufacturing company	Dilution
CD20	L26	DAKO	1:200
CD79a	HM57	DAKO	1:200
CD10	56C6	Novocastra Laboratories	1:40
Bcl-6	PG-B6P	DAKO	1:25
Bcl-2	124	DAKO	1:50
MUM1	MUM-1P	DAKO	1:200
CD5	4C7	Novocastra Laboratories	1:10
Cyclina D1	P2D11F11	Novocastra Laboratories	1:10
CD3	PS1	Novocastra Laboratories	1:50

of marginal zone (n = 3; 37.5%), centre-follicular primary cutaneous lymphoma (n = 3; 37.5%), diffuse primary cutaneous lymphoma with large B cell (n = 2; 25%). Immunohistochemical features of tumor cells for each subtype of primary cutaneous B cell lymphoma are summarized in Table II.

**Tabelul II. Particularitățile imunohistochimice ale LCPCB (+ = pozitiv; - = negativ; +/- = expresie variabilă, predominant pozitivă; -/+ = expresie variabilă, predominant negativă)**

	CD20	CD79a	Bcl-2	Bcl-6	CD10	MUM1	CD5	Cyclină D1	CD3
Limfom cutanat primar cu celule B de zonă marginală	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Limfom primar cutanat centro-folicular	+	+	-	+	±	-	-	-	-
Limfom primar cutanat difuz cu celule B mari	+	+	+	+	±	+	-	-	-

**Table II. Immunohistochemical particularities of LCPCB (+ = positive; - = negative, +/- = variable expression, predominantly positive, -/+ = variable expression, predominantly negative)**

	CD20	CD79a	Bcl-2	Bcl-6	CD10	MUM1	CD5	Cyclină D1	CD3
Primary cutaneous lymphoma with marginal zone B cells	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Primary cutaneous centrofollicular lymphoma	+	+	-	+	±	-	-	-	-
Primary cutaneous diffuse lymphoma with large B cell	+	+	+	+	±	+	-	-	-



## Discuții

### *Limfomul cutanat primar cu celule B de zonă marginală*

Conform denumirii, originea acestui limfom este postulatată la nivelul celulelor B din zona marginală a foliculilor limfoizi secundari. Infiltratul tumoral interesează dermul și este dispus difuz sau nodular și constituit din limfocite de talie mică sau medie. Nucleii sunt ușor neregulați, cu cromatina moderat dispersată, fără nucleoli vizibili, iar citoplasma este amplă, palid-eozinofilă, amintind aspectul centrocitelor [7]. Frecvent sunt intercalate plasmocite, iar acumularea de celule cu citoplasmă palid-eozinofilă poate crea un aspect monocitoid (Fig. 1). Examinarea la mărire mică evidențiază un aspect cunoscut sub denumirea de „pattern invers” caracterizat prin prezența unor zone centrale întunecate înconjurate de zone mai luminoase formate din celule palid-colorate. Infiltratul tumoral poate coloniza centrul germinativ, uneori distrugându-i complet, devenind astfel dificil de recunoscut [8]. În aceste situații, evidențierea unei rețele de celule dendritice foliculare, prin imunomarcaj cu marker-ul CD21, facilitează recunoașterea centrilor germinativi rezanți [9]. Ocazional, infiltratul tumoral este dispus în jurul anexelor tegumentare cu infiltrarea acestora și producerea

## Discussions

### *Primary cutaneous B cell lymphoma of marginal zone*

Under the name, origin of this lymphoma is postulated in the marginal zone B cells follicles secondary lymphoid. Tumor infiltrate dermis is interested and is willing diffuse or nodular and composed of small or medium lymphocytes. The nuclei are slightly irregular with moderately dispersed chromatin without visible nucleoli, and cytoplasm is broad, pale eosinophilic, reminding of the centrocytes appearance [7]. There are frequently interleaved plasma cells and accumulation of cells with pale eosinophilic cytoplasm may create a monocytoid appearance (Fig. 1.). The examination of the small size highlights an issue known as „reverse pattern” characterized by the presence of dark central area surrounded by brighter areas consisting of pale-colored cells. Tumor infiltration can colonize germ centers, sometimes destroying them completely, thus becoming difficult to recognize [8]. In these situations, evidence of a dendritic cell networks by immune marking with the CD21 marker facilitates the recognition of the location of germ centers [9]. Occasionally, the tumor infiltrate is arranged around skin annexes with their infiltration and production of lymph epithelial lesions in a similar manner to those

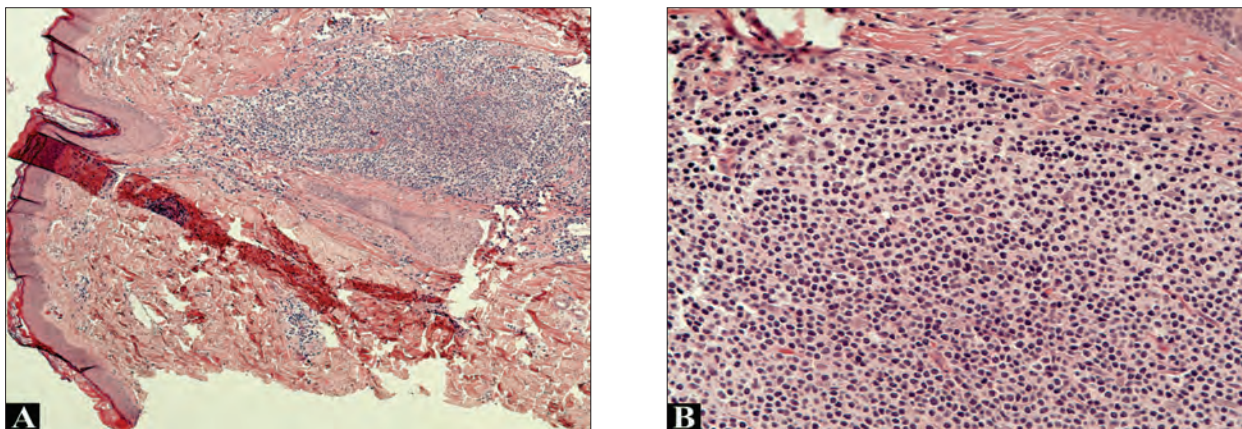


Fig. 1. Limfom cutanat primar cu celule B de zonă marginală

A. Proliferare tumorală cu pattern nodular localizată la nivelul dermului fără interesarea epidermului

B. Infiltrat cu aspect monocitoid format din limfocite mici sau medii cu citoplasmă abundentă, palid-eozinofilă

Fig. 1. Primary cutaneous B cell of marginal zone lymphoma

A. tumor proliferation with nodular pattern localized in the dermis without involving the epidermis

B. the monocytoid infiltrate composed of small or medium lymphocytes with abundant cytoplasm, pale eosinophilic

de leziuni limfoepiteliale într-o manieră similară celor descris în limfomul de zonă marginală de tip MALT localizat la nivelul tractului gastrointestinal [10].

Imunofenotipic limfomul cutanat primar cu celule B de zonă marginală păstrează caracteristicile limfocitelor B din zona marginală, celulele tumorale fiind pozitive pentru CD19, CD20, CD22, CD79a și Bcl-2 și negative pentru Bcl-6, CD5, CD10 și Cyclin D1 (Fig. 2) [11]. Prezența izolată de limfocite Bcl-6 pozitive, cu un pattern de distribuție similar celulelor dendritice foliculare și invers față de expresia Bcl-2, permite evidențierea centrilor germinativi restanți în urma infiltrării tumorale (Fig. 3) [12].

#### *Limfomul cutanat primar centrofolicular*

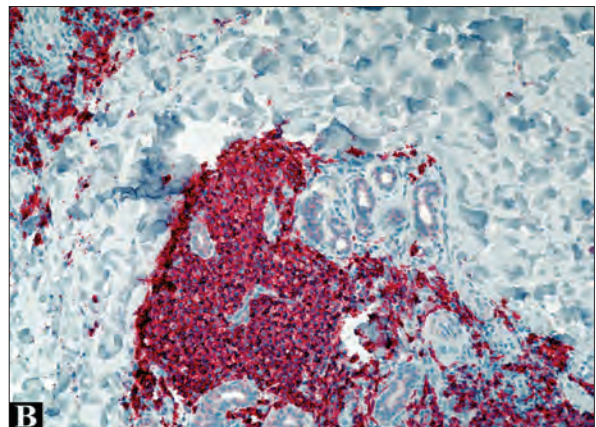
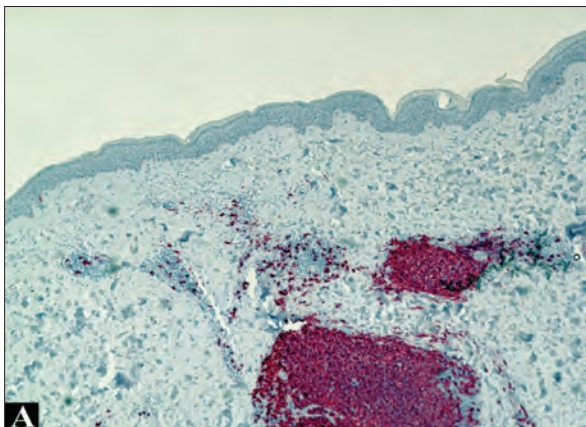
Limfomul centrofolicular se dezvoltă de la nivelul limfocitelor centrului germinativ (centrocite și centroblaste) și prezintă un pattern morfologic variabil, cu aspect folicular, folicular și difuz sau difuz în stadiile avansate. Infiltratul tumoral este localizat la nivelul dermului, frecvent cu extindere spre hipoderm (Fig. 4). Foliculii neoplazici sunt dispuși aglomerat, „spate în spate” și prezintă caracteristic un infiltrat relativ monomorf, constituit în proporții variabile din celule de dimensiuni medii sau mari, cu activitate mitotică redusă și un număr scăzut de macrofage cu corpi tingibili, cu absența

described in marginal zone lymphoma of MALT type located in the gastrointestinal tract [10].

Primary cutaneous immune-phenotypic lymphoma with marginal zone B cell retain the characteristics of the marginal zone B lymphocytes, the tumor cells were positive for CD19, CD20, CD22, CD79a and Bcl-2 and negative for Bcl-6, CD5, CD10 and Cyclin D1 (Fig. 2.) [11]. The isolated presence of Bcl-6 positive lymphocytes, with a similar distribution pattern of dendritic follicular cells and back to the Bcl-2 expression, allows the highlight of the germ centers rests from tumor infiltration (Fig. 3.) [12].

#### *Primary cutaneous lymphoma centrofolicular*

The centre-follicular lymphoma is developing from the germinal center lymphocytes (centrocyte and centre-blasts) lymphocytes and has variable morphological patterns, with follicular, folicular and diffuse or diffuse in advanced stages aspects. The tumor infiltrate is located in the dermis, often extending to the hypodermis (Fig. 4.). Neoplastic follicles are busy willing, „back to back” and present a relatively monomorph infiltrate consisting in varying proportions of medium and large sized cells with low mitotic activity and a low number of macrophages with the body pan, with no appearance of the sky starry created by them in



*Fig. 2. Limfom cutanat primar cu celule B de zonă marginală  
A. Imunomarcaj cu CD20 – expresie intensă la nivelul celulelor tumorale  
B. Celule tumorale CD20 pozitive dispuse perianexial  
Fig. 2. Primary cutaneous B cell of marginal zone lymphoma  
A. Immune-marking with CD20 - intense expression in tumor cells level  
B CD20 positive tumor cells arranged perianexially*



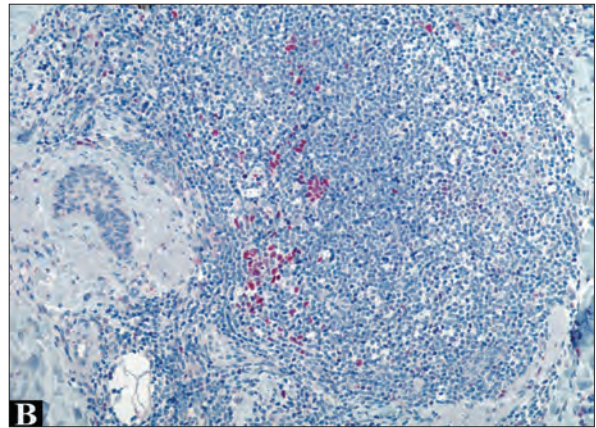
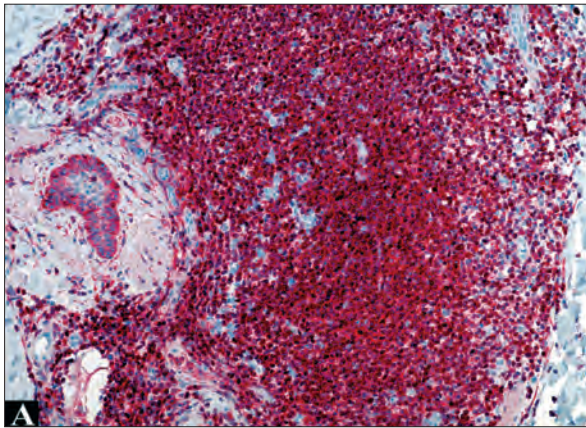


Fig. 3. Limfom cutanat primar cu celule B de zonă marginală

A. Expresie intensă a Bcl-2 cu celule izolate negative

B. Expresie negativă a celulelor tumorale pentru Bcl-6 (Bcl-2 și Bcl-6 prezintă un pattern invers de expresie, celulele izolate Bcl-6 pozitive și Bcl-2 negative reprezentând resturi ale unui centru germinativ infiltrat tumoral)

Fig. 3. Primary cutaneous B cell of marginal zone lymphoma

A strong expression of Bcl-2 with negative isolated cells

B. the negative expression of tumor cells for Bcl-6 (Bcl-2 and Bcl-6 shows a reverse pattern of expression, the Bcl-6 positive and Bcl-2 negative isolated cells representing the rests of a germinal center tumor infiltration)

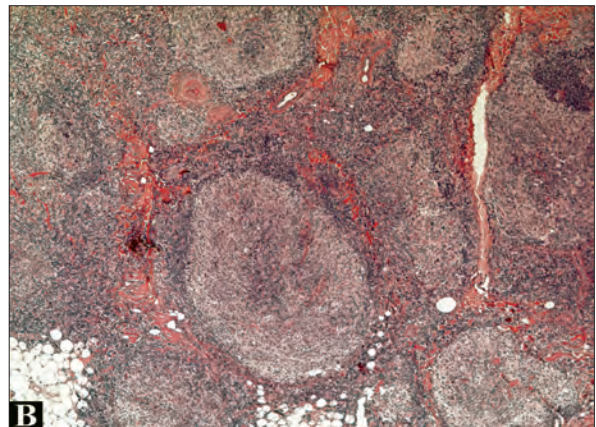
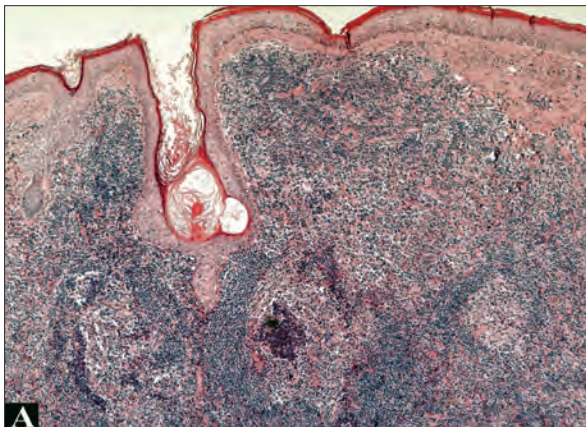


Fig. 4. Limfom cutanat primar centrofolicular

A. Infiltrat limfoid cu pattern folicular și difuz

B. Infiltrat cu pattern folicular, cu foliculi dispuși aglomerat, „spate în spate”, localizați la nivelul dermului cu extindere spre hipoderm

Fig. 4. Primary cutaneous centre-follicular lymphoma

A. lymphoid infiltrate with follicular and diffuse patterns

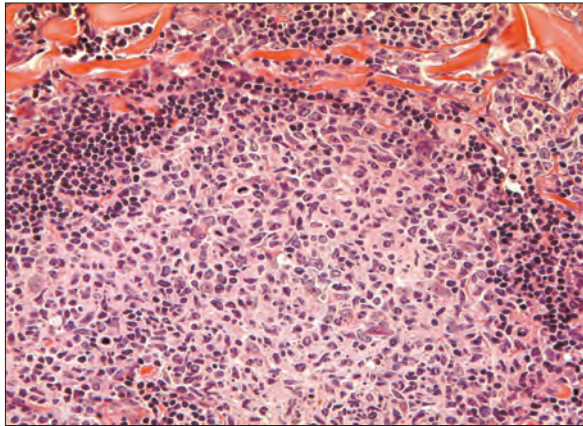
B. infiltrate with follicular pattern, with follicles crowded “back to back”, located at dermal level extending to hypodermis

aspectului de cer înstelat creat de aceștia în centrul germinativ netumoral. Frecvent zona de manta este mult redusă sau absentă (Fig. 5) [13].

Celulele tumorale exprimă markeri specifici limfocitelor B fiind pozitive pentru CD19, CD20, CD22 și CD79a. De asemenea sunt pozitive pentru markeri specifici limfocitelor de la nivelul centrului germinativ, exprimând constant Bcl-6 și

non-tumor germ centers. Common zone is often much reduced or absent mantle (Fig. 5.) [13]. Tumor cells express specific markers, the B lymphocytes are positive for CD19, CD20, CD22 and CD79a. There are also positive for specific markers of lymphocytes from the germ level center, constantly expressing Bcl-6 and variable CD10, and the cases with follicular growth

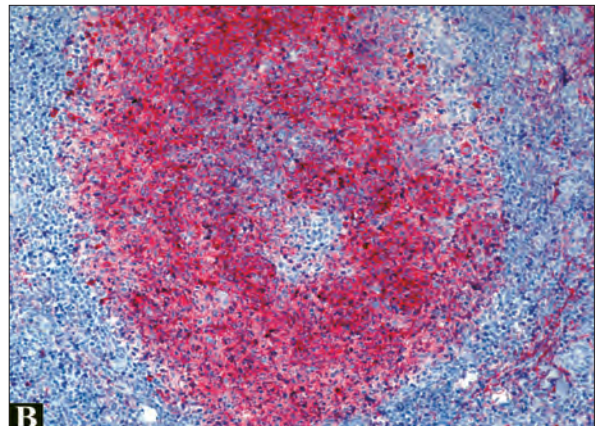
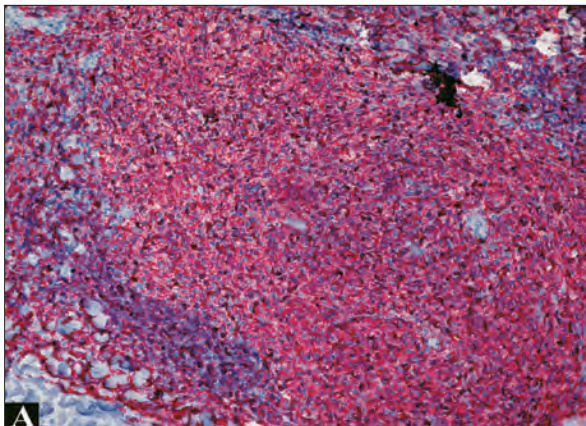




*Fig. 5. Limfom cutanat primar centrofollicular. Detaliu la mărire mai mare a unui folicul neoplazic constituit în proporții variabile din celule de talie medie și mare, centrocit-și centroblast-like, cu absența macrofagelor cu corpi tingibili*  
*Fig. 5. Primary cutaneous centre-follicular lymphoma Detail at a higher magnification of a neoplastic follicle formed in varying proportions of medium and large sized cells, centre-blast and centre-cit-like, with no pan bodied macrophages*

variabil CD10; cazurile cu pattern de creștere folicular fiind frecvent pozitive pentru CD10, iar cele cu creștere difuză frecvent negative (Fig. 6) [14]. Prezența celulelor Bcl-6 și CD10 pozitive în afara centrilor germinativi este înalt sugestivă pentru o proliferare tumorală [15]. Este acceptată prezența izolată de celule Bcl-6 pozitive în ariile interfoliculare, acest anticorp fiind exprimat și de

pattern are often positive for CD10, while those with diffuse growth often negative (Fig. 6.) [14]. The presence of Bcl-6 cells and CD10 positive except for germ centers is highly suggestive for a tumor proliferation [15]. It is accepted the Bcl-6 positive cells isolated presence in inter-follicular areas, this antibody being expressed and by a few highlighted T lymphocytes through CD3 positive

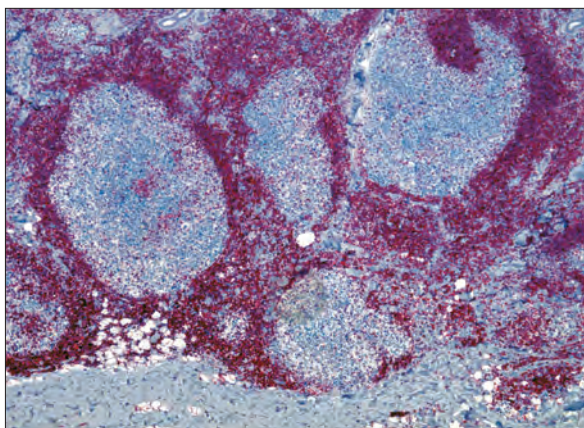


*Fig. 6. Limfom cutanat primar centrofollicular*  
*A. Celule tumorale pozitive la imunomarcajul cu CD20*  
*B. Reacție imunohistochimică pozitivă pentru CD10*  
*Fig. 6. Primary cutaneous centre-follicular lymphoma*  
*A positive tumoral cells at the immune-marked with CD20*  
*B. Immune-histochemical positive reaction for CD10*



un număr redus de limfocite T evidențiate prin pozitivare pentru CD3. Absența expresiei CD3 la nivelul limfocitelor Bcl-6 pozitive localizate în afara centrului germinativ și dispunerea acestora în grupuri susține diagnosticul de limfom folicular. Spre deosebire de limfoamele foliculare limfonodale, limfoamele centrofoliculare cutanate primare sunt negative pentru Bcl-2, o moleculă antiapoptotică neexprimată de limfocitele B din centrul germinativ normal dar prezentă constant în transformările neoplazice (Fig. 7) [16]. Astfel, expresia Bcl-2 în celulele tumorale ale unui limfom folicular cutanat este înalt sugestivă pentru originea limfonodulară a acestuia, cu implicare cutanată secundară. Această particularitate, precum și absența translocăției (14; 18) în cazurile de limfom centrofolicular cutanat primar [17], prezentă în majoritatea cazurilor de limfom folicular limfonodal, indică o patogeneză diferită pentru cele două leziuni [18, 19]. Negativitatea limfomului centrofolicular cutanat primar pentru Bcl-2 îngreunează diferențierea de hiperplazia limfoidă reactivă care este de asemenea negativă pentru acest marker. În aceste cazuri distincția între infiltratul limfoid reactiv policlonal și infiltratul neoplazic monoclonal se bazează în special pe prezența sau absența expresiei restricționate a lanțurilor ușoare de imun-globuline  $\kappa$  și  $\lambda$  (Ig).

value for. The absence of CD3 expression in the Bcl-6 positive cell lymphocytes level located outside the germ center and in their groups arrangement, supports the diagnosis of follicular lymphoma. Unlike lymph-node follicular lymphomas, the primary cutaneous centre-follicular lymphoma is negative for Bcl-2, an antiapoptotic molecule non-expressed by B lymphocytes from normal germ centers but consistently present in neoplastic transformations (Fig. 7.) [16]. Thus, the Bcl-2 expression in tumor cells of a cutaneous follicular lymphoma is highly suggestive for its lymph-nodular origin, with secondary skin involvement. This feature and the absence of translocation (14, 18) in primary cutaneous centre-follicular lymphoma cases [17], present in most follicular lymphoma lymph-node cases, indicates a different pathogenesis for the two lesions [18, 19]. The primary cutaneous centre-follicular lymphoma negativity for Bcl-2 makes it difficult to differentiate from reactive hyperplasia lymphoid which is also negative for this marker. In these cases the distinction between the reactive polyclonal lymphoid infiltrate and monoclonal neoplazic infiltrate, is based primarily on the presence or absence of restricted expression of a light chain of immune-globulins  $\kappa$  and  $\lambda$  (Ig).



*Fig. 7. Limfom cutanat primar centrofolicular. Celule tumorale negative pentru Bcl-2 cu pozitivarea limfocitelor B netumorale dispuse perinodular*

*Fig. 7. Primary cutaneous centre-follicular lymphoma. The negative tumor cells for Bcl-2 with the positivity value of B non-tumor lymphocytes perinodularly arranged*

### *Limfomul cutanat primar difuz cu celule B mari*

Limfomul cutanat primar difuz cu celule B mari cuprinde doua subgrupe lezionale: varianta „leg type”, și varianta „others” care include toate celelalte forme de manifestare care nu întrunesc criteriile variantei „leg type”. Cea mai frecvent întâlnită este varianta „leg type” care, după cum sugerează și numele, este localizată cu predilecție la nivelul piciorului. Totuși, indiferent de localizare, leziunile cu caracteristici morfologice și imunohistochimice definitorii pentru varianta „leg type” sunt incluse în această categorie.

Varianta „leg type” se prezintă histologic sub forma unui infiltrat limfoid cu pattern de creștere difuz care ocupă dermul cu extindere spre hipoderm, frecvent fără infiltrarea epidermului. Infiltratul tumoral este monomorf, compus din limfocite B de talie medie sau mare asemănătoare centroblaștilor, cu nuclei mari neclivați și nucleoli evidenți atașați membranei nucleare. Se pot observa de asemenea și imunoblaști, celule cu nucleu mare, veziculos și nucleoli situați predominant central. Spre deosebire de limfomul centrofolicular nu se remarcă centrocite, un aspect util în diferențiere formelor difuze ale limfomului centrofolicular de limfomul cutanat primar difuz cu celule B mari. Nucleii sunt predominant de formă rotundă, cu cromatina dispusă grosier, în bulgări și cu frecvente figuri mitotice (Fig. 8) [20].

Imunofenotipic, celulele tumorale exprimă CD19, CD20, CD22 și CD79a, markeri care confirmă origina de linie B. Bcl-6 este exprimat în majoritatea cazurilor, în timp ce markerii CD5, CD10 și Cyclina D1 sunt negativi. Pozitivitatea intensă pentru Bcl-2 și MUM-1 este o caracteristică importantă a acestui tip de limfom, indiferent de localizare (Fig. 9.) [21]. Acest aspect contribuie, alături de morfologia infiltratului, la diferențierea dintre limfomul cutanat primar centrofolicular cu pattern de creștere difuz, negativ pentru Bcl-2 și MUM-1/IRF4 și limfomul cutanat primar difuz cu celule B mari [22].

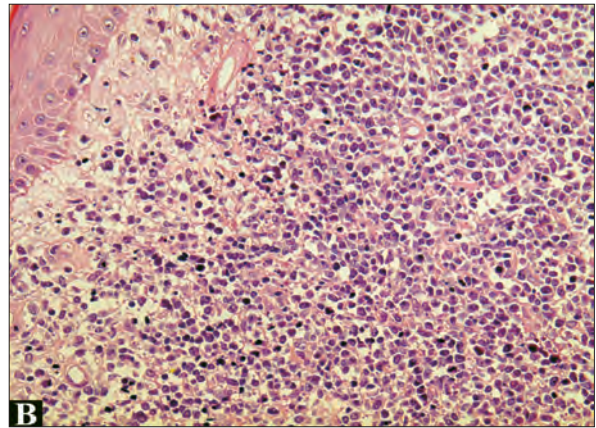
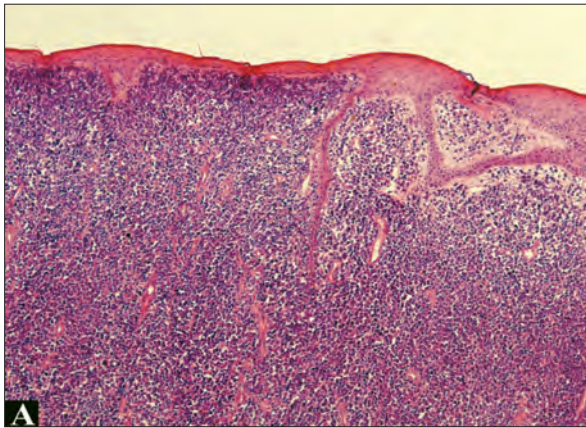
### *Primary cutaneous lymphoma, diffuse large B cell*

The primary diffuse cutaneous lymphoma with large B-cell includes two lesion subgroups: „link type” version and the „others” variable which includes all other forms of expression that do not meet the „leg type” variant criteria. The more common variant is the “leg type” which, as its name suggests, is located with predilection in the foot level. However, regardless of the location, lesions with morphological and immunohistochemical defining characteristics for the “leg type” version are included in this category.

Histological speaking the “leg type” version features as a lymphoid infiltrate form with growth diffuse pattern occupying the extending dermis to the hypodermis, often without infiltration of the epidermis. The infiltrate tumor is mono-morph, composed of medium or big sized B-lymphocytes similar with centre-blasts, with large non-split nuclei and obvious nucleoli attached to membrane nucleus. There are also immune-blasts, cells with large nucleus, vesicular and predominantly centrally located nucleolus. Unlike the centre-follicular lymphoma there are no centrocyte notes, a useful point in the differentiation in diffuse forms of centre-follicular lymphoma and of primary cutaneous diffuse lymphoma with large B cell. Nuclei are predominantly round with chromatin coarse arranges in lumps and frequent mytotic figures (Fig. 8.) [20].

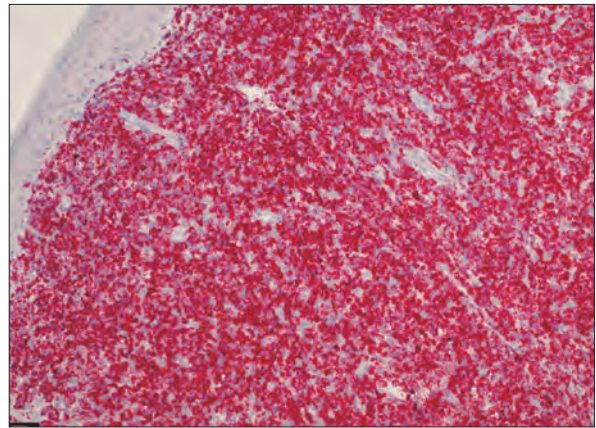
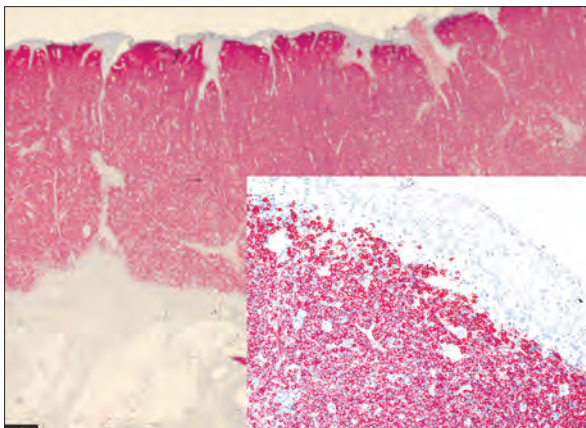
Immune-phenotype tumor cells expressed as CD19, CD20, CD22 and CD79a, are markers which confirm the original B line. Bcl-6 is expressed in most cases, while CD5, CD10 and Cyclin D1 markers are negative. The intense positivity for Bcl-2 and Mum-1 is an important feature for this type of lymphoma, regardless of the location (Fig. 9.) [21]. This aspect contributes, along with infiltrate morphology, to the distinction between primary cutaneous centre-follicular lymphoma with diffuse growth pattern, negative for Bcl-2 and MUM-1/IRF4 and the primary cutaneous diffuse lymphoma with large B cell [22].





*Fig. 8. Limfom cutanat primar difuz cu celule B mari*  
*A Proliferare limfoidă cu infiltrarea difuză a dermului și distrugerea structurilor anexiale*  
*B. Infiltrat tumoral monomorf, compus din limfocite de talie medie sau mare*

*Fig. 8. Primary cutaneous diffuse with large B cell lymphoma*  
*A. The diffuse lymphoid proliferation with the diffuse infiltration of the dermis and the destruction of adnexal structures*  
*B. mono-morph tumor infiltrate composed by medium or large size lymphocytes*



*Fig. 9. Limfom cutanat primar difuz cu celule B mari*  
*A. Infiltrat tumoral pozitiv pentru CD20*  
*B. Pozitivitate intensă a celulelor tumorale pentru Bcl-2*  
*Fig. 9. Primary cutaneous diffuse with large B cell lymphoma*  
*A the positive tumoral infiltrate for CD20*  
*B. intense positivity for Bcl-2 tumor cells*

## Concluzii

În clasificările recente, încadrarea tumorilor limfoide se bazează în special pe evaluarea imunohistochimică integrată în contextul clinic și morfologic. Din punct de vedere clinic interesează localizarea și modul de evoluție a leziunii, iar din punct de vedere histologic se evaluează atât pattern-ul de creștere al infil-

## Conclusions

In recent classifications, the framing of the lymphoid tumors is based primarily on immunohistochemical evaluation under clinical and morphological context. In clinical terms is made on the location and the development of lesion, while from the histological point of view is evaluated both the growth pattern of tumor



tratului tumoral cât și aspectul morfologic al populației de celule tumorale.

În concluzie sintetizăm markerii imuno-histochemici utili în diagnosticul limfoamelor cutanate primare cu celule B și propunem următorul algoritm de diagnostic:

1. Pentru confirmarea naturii tumorale și a originii celulare a infiltratului:
  - originea de linie B a infiltratului celular poate fi stabilită prin pozitivarea pentru unul sau mai mulți din următorii markeri: CD19, CD20, CD22 și CD79a;
  - natura monoclonală (tumorală) a infiltratului limfoid se poate evidenția prin identificarea expresiei monotipice a lanțurilor ușoare de imunoglobuline.
2. În funcție de aspectul morfologic se folosesc următorii anticorpi pentru confirmarea variantei de limfom cutanat primar cu celule B:
  - a) Patternul morfologic folicular sau folicular și difuz este întâlnit în limfomul cutanat primar folicular și în limfomul cutanat primar de zonă marginală.
    - expresia pozitivă pentru Bcl-6 și CD10 și negativă pentru Bcl-2 la nivelul structurilor foliculare și în grupuri de celule care infiltrează difuz spațiile interfoliculare este specifică limfomului primar cutanat centrofolicular;
    - expresia puternică pentru Bcl-2, Bcl-6 și CD10 trebuie să ridice întotdeauna suspiciunea unui limfom folicular sistemic cu implicare cutanată secundară;
    - expresia pozitivă pentru Bcl-2 și negativă pentru Bcl-6 și CD10 la nivelul infiltratului este sugestivă pentru limfomul primar cutanat de zonă marginală;
    - în cazuri selecționate markerii CD5 și Cyclină D1 sunt utili în diagnosticul diferențial dintre limfomul primar cutanat de zonă marginală (CD5-, Cyclină D1-), limfomul cu celule din zona de manta cu infiltrarea secundară a tegumentului (CD5+, Cyclină D1+) și determinarea cutanată a limfomului/leucemiei limfocitice cu celule B (CD5+, Cyclină D1-).
  - b) Patternul morfologic difuz este caracteristic limfomului cutanat primar difuz cu celule B mari și formelor avansate ale limfomului primar cutanat centrofolicular.

infiltrate and morphological aspect of tumor cell population are evaluated.

In conclusion we gather useful immunohistochemical markers in the diagnosis of primary cutaneous B cell lymphomas and suggest the following diagnostic algorithm:

1. To confirm the tumor cell nature and origin of the infiltrate:
  - The B cell infiltrate origin line may be determined by the positive value for one or more of the following markers: CD19, CD20, CD22 and CD79a;
  - Monoclonal nature (tumor) of the lymphoid infiltrate can be showed through identifying the monotype expression of immunoglobulin light chains.
2. Depending on the morphological appearance the following antibodies are used to confirm the variant of primary cutaneous B cell lymphoma:
  - a) The morphological follicular pattern or follicular and diffuse is found in primary cutaneous follicular lymphoma and in primary cutaneous marginal zone lymphoma.
    - The positive expression for Bcl-6 and CD10 and the negative one for Bcl-2 in the follicular structures level and in groups of cells that diffusely infiltrate the inter-follicular spaces is specific for the primary cutaneous centre-follicular lymphoma;
    - The strong expression of Bcl-2, Bcl-6 and CD10 should always raise the suspicion of a follicular systemic lymphoma with secondary skin involvement;
    - The positive expression of Bcl-2 and negative for Bcl-6 and CD10 in the infiltrate level is suggestive for primary cutaneous marginal zone lymphoma;
    - In the selected cases, CD5 and Cyclin D1 markers are useful in the differential diagnosis of the primary cutaneous marginal zone lymphoma (CD5-, Cyclin D1-), the lymphoma with cells from the mantle zone with secondary skin infiltration (CD5+, Cyclin D1+) and the cutaneous lymphoma / leukemia B-cell lymphoma (CD5+, D1-Cyclin) determination.
  - b) the diffuse morphological pattern is characteristic for the primary cutaneous

- expresia intensă a infiltratului pentru Bcl-2 și MUM-1, cu expresie variabilă pentru Bcl-6 și expresie negativă pentru CD10 sunt definitorii pentru limfomul cutanat primar difuz cu celule B mari „leg type”;
- negativitatea infiltratului tumoral pentru Bcl-2 și MUM-1 este sugestivă pentru forma de creștere difuză a limfomului primar cutanat centrofollicular.

*Intrat în redacție: 20.10.2009*

- diffuse large B cell lymphoma and the advanced forms of primary cutaneous centre-follicular lymphoma.
- intense infiltrate expression for Bcl-2 and Mum-1, with variable expression of Bcl-6 and negative one for CD10 are characteristic for primary cutaneous diffuse lymphoma with “leg type” large B-cell;
  - the tumor infiltrate negativity for Bcl-2 and Mum-1 is suggestive for the diffuse growth form of primary cutaneous centre-follicular lymphoma.

*Received: 20.10.2009*

## Bibliografie/Bibliography

1. Burg G, Kempf W, Katakov DV, et al. - WHO/EORTC classification of cutaneous lymphomas. In: Burg G, Katakov DV, ed. Cutaneous lymphomas. Marcel Dekker, Francis & Taylor, New York; 2005.
2. Elena Lazăr, Alis Dema, Sorina Tăban et al, Morfopatologie generală, Editura Eurobit, Timișoara 2008.
3. Hortensia Ioniță, Mihăiescu Rodica, Bătrânu Maria, et al, Hematologie Clinică - Bazele Medicinii Interne, volumul 4, LITO-UMFTimișoara, 2002
4. Willemze R, Jaffe ES, Burg G, et al. - WHO-EORTC classification for cutaneous lymphomas. *Blood* 2005; 105: 3768.
5. Burg G, Jaffe ES, Kempf W, et al. - WHO-EORTC classification of cutaneous lymphomas. In: Leboit P, Burg G, Weedon D, Sarasin A, ed. WHO books: tumors of the skin. Lyon: WHO IARC; 2005.
6. Nancy J. Senff, Evert M. Noordijk, Youn H. Kim 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* 2008; 112: 1600-1609
7. Tomaszewski MM, Abbondanzo SL, Lupton GP. Extranodal marginal zone B-cell lymphoma of the skin: a morphologic and immunophenotypic study of 11 cases. *Am J Dermatopathol* 2000; 22: 205.
8. Cerroni L, Signoretti S, Hofler G, et al. Primary cutaneous marginal zone B-cell lymphoma: a recently described entity of low-grade malignant cutaneous B-cell lymphoma. *Am J Surg Pathol* 1997; 21: 1307.
9. Bagdi E, Krenacs L, Krenacs T, et al.. Follicular dendritic cells in reactive and neoplastic lymphoid tissues: a reevaluation of staining patterns of CD21, CD23, and CD35 antibodies in paraffin sections after wet heatinduced epitope retrieval. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2001;9:117-124.
10. Servitje O, Gallardo F, Estrach T, et al. Primary cutaneous marginal zone B-cell lymphoma: a clinical, histopathological, immunophenotypic and molecular genetic study of 22 cases. *Br J Dermatol* 2002; 147: 1147.
11. Hoefnagel JJ, Vermeer MH, Jansen PM, et al. Bcl-2, Bcl-6 and CD10 expression in cutaneous B-cell lymphoma: further support for a follicle centre cell origin and differential diagnostic significance. *Br J Dermatol* 2003; 149: 1183.
12. de Leval L, Harris NL, Longtine J, et al. Cutaneous b-cell lymphomas of follicular and marginal zone types: use of Bcl-6, CD10, Bcl-2, and CD21 in differential diagnosis and classification. *Am J Surg Pathol* 2001; 25: 732.
13. Cerroni L, Arzberger E, Putz B, et al. Primary cutaneous follicle center cell lymphoma with follicular growth pattern. *Blood* 2000; 95: 3922.
14. Dunphy CH, Polski JM, Lance Evans H, et al. Paraffin immunoreactivity of CD10, CDw75, and Bcl-6 in follicle center cell lymphoma. *Leuk Lymphoma* 2001;41:585-592.
15. Dogan A, Bagdi E, Munson P, et al. CD10 and BCL-6 expression in paraffin sections of normal lymphoid tissue and B-cell lymphomas. *Am J Surg Pathol* 2000;24:846-852.
16. Cerroni L, Volkenandt M, Rieger E, et al. bcl-2 protein expression and correlation with the interchromosomal 14;18 translocation in cutaneous lymphomas and pseudolymphomas. *J Invest Dermatol* 1994; 102: 231.

17. Child FJ, Russell-Jones R, Woolford AJ, et al. Absence of the t(14;18) chromosomal translocation in primary cutaneous B-cell lymphoma. *Br J Dermatol* 2001; 144: 735.
18. Bergman R, Kurtin PJ, Gibson LE, et al. Clinicopathologic, immunophenotypic, and molecular characterization of primary cutaneous follicular B-cell lymphoma. *Arch Dermatol* 2001; 137: 432.
19. Mirza I, Macpherson N, Paproski S, et al. Primary cutaneous follicular lymphoma: an assessment of clinical, histopathologic, immunophenotypic, and molecular features. *J Clin Oncol* 2002; 20: 647.
20. Kodama K, Massone C, Chott A, et al. Primary cutaneous large B-cell lymphomas. Clinico-pathologic features, classification, and prognostic factors in a large series of patients. *Blood* 2005; 106: 2491-97.
21. Paulli M, Viglio A, Vivenza D, et al. Primary cutaneous large Bcell lymphoma of the leg: histogenetic analysis of a controversial clinicopathologic entity. *Hum Pathol* 2002; 33: 937.
22. Falini B, Fizzotti M, Pucciarini A, et al. A monoclonal antibody (MUM1p) detects expression of the MUM1/IRF4 protein in a subset of germinal center B cells, plasma cells, and activated T cells. *Blood*. 2000;95:2084-2092

Adresă de corespondență:  
Mailing address:

Herbeck Rosemarie  
Spitalul Clinic Județean de Urgență Timișoara  
Bd. Iosif Bulbuca nr. 10, Cod 300736, Timișoara, România  
Tel.: 0722-574.300, E-mail: roseherbeck@yahoo.com