



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Diferències histopatològiques entre els limfomes cutanis primaris i secundaris: una anàlisi dels limfomes fol·liculars i T/NK

Maria Josepa Climent Esteller

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE BARCELONA

Programa de doctorat: Medicina i Recerca Translacional.

Títol de la tesi:

Diferències histopatològiques entre els limfomes cutanis primaris i secundaris: una anàlisi dels limfomes fol·liculars i T/NK.

Tesi presentada per

Maria Josepa Climent Esteller

Per optar al grau de doctor en Medicina

Directors de la tesi:

Octavi Servitje Bedate (Director i tutor), Hospital Universitari de Bellvitge.

Joan Cid Vidal (Director), Hospital Clínic de Barcelona.

Facultat de Medicina (Universitat de Barcelona)

Barcelona, desembre 2020

AGRAÏMENTS

Hi ha moments a la vida on has de repensar-te les coses, prendre decisions i tirar endavant. El projecte de la tesi doctoral el tenia pendent des de sempre. Ho anava endarrerint per múltiples raons, sempre hi havia coses que passaven davant. Fins que va arribar un dia, ara fa un parell d'anys que gràcies a Octavi i a Joan vaig prendre la decisió de presentar la tesi doctoral. Gràcies Octavi per haver confiat amb mi i haver-me ajudat tant en el dia a dia dels casos i en haver-me engrescat en la recerca dels limfomes cutanis.

Gràcies als patòlegs que em van fer apassionar per la patologia i en especial l'hematopatologia. No voldria deixar-me a ningú, però potser destacaria des que vaig començar la carrera a Juanjo Sirvent, el primer patòleg que vaig conèixer i que sempre l'he considerat el meu mentor i amic. Roger Bernat, Marta Carrera, Isabel Català, Abelardo Moreno i Vicens Romagosa, els que em van acollir com a resident. A Vicens li dec molt, l'hematopatologia la vaig aprendre amb ell. A la mateixa època vaig conèixer a Enric Condom, un dels meus referents. De vegades penso que tenim el mateix mecanisme mental quan veiem un cas junts, i això em congratula. Però no, ell sempre va més enllà, sempre fins l'últim i petit detall. De l'època de resident, encara tinc companys i amics als que tampoc voldria oblidar aquí, sobretot a Míriam Carulla i August Vidal. I dels actuals companys al servei d'anatomia també aprenc cada dia. N'hi ha que no s'han format amb nosaltres però que ja sembla que sempre hagin estat de Bellvitge: Montse, Anna, Roger, Xavi, Xavier, moltes

gràcies. Xavier Matias fa poc que ens lidera però ha donat l'empenta que li calia al servei. Gràcies.

Tampoc vull oblidar al grup de Biobanc, Laura, Àlex i Jesús. Amb vosaltres he hagut d'iniciar-me en la gestió d'un petit grup de persones. M'agrada treballar amb vosaltres.

Ara bé, la meva passió és l'hematopatologia i aquí he d'agrair a Elias Campo, el mestre, que sempre l'he tingut a prop, que m'ensenya i ajuda i que sempre ens inculca l'interès per la recerca. Gràcies a ell vaig conèixer a Elaine Jaffe. L'estada a Bethesda la tardor de 2009 i els estius posteriors va significar tot en la meva formació. Mai havia disfrutat tant veient casos i estudiant durant hores al seu costat.

Si la meva passió són els limfomes, la meva debilitat és la meva família. Els meus pares i germans que sempre han estat al meu costat i als que agraeixo la confiança cega que tenen en mi. Els meus fills, Anna, Enric i Jordi, les meves ninetes dels ulls, ho són tot per mi. Suposo que com totes les mares ens desvivim per poder arribar a tot, intentant no descuidar res. Amb l'exigència de la nostra feina de vegades això no és possible. Persistiré.

L'últim paràgraf d'agraïment és per Joan, el meu marit i company des de fa 30 anys. Joan m'estima tal com sóc, m'encoratja cada dia a continuar i a progressar en tot i m'acompanya en l'engranatge d'una vida junts. T'estimo.

El Dr. Octavi Servitje Bedate, cap de servei de Dermatologia de l'Hospital Universitari de Bellvitge i el Dr. Joan Cid Vidal, metge especialista consultor-1 del servei d'Hemoteràpia i Hemostàsia de l'Hospital Clínic de Barcelona.

Certifiquen que:

La present tesi doctoral "**Diferències histopatològiques entre els limfomes cutanis primaris i secundaris: una anàlisi dels limfomes fol·liculars i T/NK**" presentada per Maria Josepa Climent Esteller, per optar al grau de Doctor en Medicina i Cirurgia, dins del programa de doctorat de "Medicina i Recerca translacional" corresponent al bienni 2018-2020, ha estat realitzada sota la nostra direcció.

El que fa constar a tots els efectes oportuns a Barcelona, 31 de desembre de 2020.

Dr. Octavi Servitje Bedate i Dr. Joan Cid Vidal.

ÍNDEX

I.- ENUMERACIÓ DELS ARTICLES QUE COMPOSEN LA TESI DOCTORAL	10
II.- INTRODUCCIÓ	17
1.- Limfomes no Hodgkin: classificació i epidemiologia	18
1.1.- Definició i epidemiologia	18
1.2.- Classificació de les neoplàsies limfoides	18
2.- Limfomes cutanis	23
2.1.- Classificació OMS-EORTC 2018	25
3.- Limfoma fol·licular	26
3.1.- Epidemiologia	26
3.2.- Histologia	26
3.3.- Variants de limfoma fol·licular	28
3.3.1.- Neoplàsia fol·licular in situ	28
3.3.2.- Limfoma fol·licular tipus duodenal	28
3.3.3.- Limfoma fol·licular extranodal	29
3.3.4.- Limfoma fol·licular a la pell	30
4.- Limfoma de cèl·lules T/NK extranodal, tipus nasal (LCTNKE)	33
4.1.- Epidemiologia i manifestacions clíniques	33
4.2.- Histopatologia, fenotip i diagnòstic diferencial	35
III.- HIPÒTESI	39
IV.- OBJECTIUS	43
V.- PACIENTS, MÈTODES I RESULTATS	46
Primer treball	47
Segon treball	55
VI.- DISCUSSIÓ	69
VII.- CONCLUSIONS	80
VIII.- BIBLIOGRAFIA	83

I.- ENUMERACIÓ DELS ARTICLES QUE COMPOSEN LA TESI DOCTORAL

PRIMER TREBALL

ORIGINAL ARTICLE

Primary cutaneous vs secondary cutaneous follicular lymphomas: A comparative study focused on BCL2, CD10, and t(14;18) expression

Octavio Servitje*, **Fina Climent***, Lluís Colomo, Nuria Ruiz, Adriana García-Herrera, Fernando Gallardo, Santiago Mercadal, Helena Pomares, Cristina Muniesa, Clara Marin-Callizo, Joaquim Marcoval, Roger Rovira, Teresa Estrach, Ramon M. Pujol.

* Ambdós autors han contribuït d'igual forma.

Journal of Cutaneous Pathology 2019;46:182-189

(Factor d'impacte 1,373, Q2)

Resum del primer treball

El limfoma fol·licular primari cutani (LFPC) és un dels principals subtipus dels limfomes B primaris cutanis. Sol manifestar-se en forma de plaques o tumors solitaris o agrupats, afectant les àrees del cap i coll o del tronc. En contrast amb els limfomes fol·liculars sistèmics, els primaris cutanis solen presentar una evolució clínica indolent i el seu tractament es basa en teràpies dirigides a la pell. Una qüestió important pel que fa al maneig dels malalts amb limfoma fol·licular cutani és la diferenciació entre si es tracta d'una afectació primària o secundària, ja que clínicament i histopatològica són molt similars. De fet, molts pacients es presenten amb afectació cutània temps abans de que l'afectació sistèmica sigui evident.

Estudis anteriors semblaven indicar que les diferències en l'expressió de bcl2 i CD10 i la presència o absència de la t(14;18) podrien ajudar a diferenciar els casos cutanis dels sistèmics. Tanmateix, estudis més recents mostraven dades contradictòries.

El significat d'aquestes troballes roman en controvèrsia degut a que el nombre d'estudis que focalitzen aquesta qüestió és pobre i aquests estudis inclouen pocs pacients.

El nostre objectiu ha estat avaluar aquestes dades anatomopatològiques emprant un estudi comparatiu clinicopatològic retrospectiu, multicèntric, als hospitals de Bellvitge, Clinic i del Mar de Barcelona.

L'estudi ha inclòs 81 pacients, 59 corresponien a LFPC i 22 a linfoma fol·licular (LF) amb afectació secundària a la pell. Dels 22 casos secundaris, l'afectació cutània va ser la primera manifestació de la malaltia en 12 d'ells (54%). Pel que fa a l'estudi immunohistoquímic, dades remarcables i diferents de les publicades a la literatura van ser que el 69% i el 66% dels casos primaris presentaven expressió de BCL2 i CD10, respectivament. Quan avaluàvem la intensitat d'expressió de BCL2, sí que hi havia diferències significatives, ja que els casos amb una intensitat forta de BCL2 eren casos de LF amb afectació secundària de la pell. L'estudi de la t(14;18) es va realitzar en 58 casos (44 primaris i 14 secundaris). De forma interessant vam identificar la translocació a 4 dels 44 casos primaris (9%). Aquests casos no van tenir pitjor pronòstic ni van acabar fent una afectació sistèmica durant tot el seguiment.

En conclusió, els nostres resultats confirmen que BCL2 i CD10 s'expressen de forma significativa als limfomes fol·liculars primaris cutanis i que la intensitat en l'expressió de BCL2 és el valor més important en la diferenciació entre un limfoma primari cutani i un secundari.

SEGON TREBALL

ORIGINAL ARTICLE

Small-cell predominant extranodal NK/T cell lymphoma, nasal type: clinicopathological analysis of a series of cases diagnosed in a Western population

Penelope A McKelvie, **Fina Climent**, Gregor Krings, Robert P Hasserjian, Jeremy S Abramson, Ben Z Pilch, Nancy Lee Harris, Judith A Ferry, Lawrence R Zukerberg & Aliyah R Sohani

Histopathology 2016; 69:667-679

(Factor d'impacte 2,025, Q1)

Resum del segon treball

El limfoma de cèl·lules T/NK extranodal (LCTNKE) és un limfoma agressiu, de localització predominantment extranodal associat al virus d'Epstein Barr (VEB) que es presenta comunament a nivell del tracte aerodigestiu alt, particularment a la cavitat nasal. Clàssicament es caracteritza per una proliferació de cèl·lules de mida mitjana/gran, amb atípia important i amb prominent angiïnvasió, angiodestrucció i necrosi tumoral. Casos constituïts per cèl·lules petites han estat descrits a les àrees endèmiques d'Àsia, Mexico i Amèrica del Sud i Central. El diagnòstic d'aquests casos a les zones no endèmiques resulta un repte degut a la baixa prevalença i a la histologia tan subtil que presenten. La dificultat en reconèixer aquests casos comporta un retard en el diagnòstic ja que es confonen amb processos reactius.

El nostre objectiu ha estat avaluar i descriure les troballes clinicopatològiques dels casos de LCTNKE amb predomini de cèl·lules petites en pacients d'Estats Units i d'Europa per tal d'ajudar a reconèixer aquests tipus de casos en les zones no endèmiques.

L'estudi ha inclòs 13 pacients, 10 d'ells amb afectació de la cavitat nasal i 3 amb afectació de la cavitat bucal. Nou casos (69%) presentaven malaltia localitzada amb estadis IE o IIE, mentre que quatre d'ells presentaven malaltia avançada amb afectació de medul·la òssia, cor, glàndula paròtide i teixits tous i pell. Aquests casos presentaven necrosi, angiïnvasió i angiodestrucció en només el 17-22% de les biòpsies examinades. La cel·lularitat era petita i amb atípia mínima. L'índex proliferatiu valorat amb el Ki67 va ser baix i oscil·lava

entre el 5 i el 10%. Els casos amb múltiples biòpsies a diferents intervals mostraven clara evidència de progressió en quant a la morfologia, la presència de necrosi i l'índex proliferatiu. Degut a que la supervivència d'aquests casos està lligada amb l'estadiatge i l'afectació extranasal, la detecció precoç dels casos pot contribuir a millorar el pronòstic dels pacients. Els quatre casos avançats amb afectació extranasal, un d'ells amb afectació cutània, van ser tractats de forma agressiva però van tenir molt mal pronòstic, el que emfatitza la importància de reconèixer-los d'hora i iniciar el tractament abans de la disseminació del tumor.

II.- INTRODUCCIÓ

1.- Limfomes no Hodgkin: classificació i epidemiologia.

1.1.- Definició i epidemiologia.

Els limfomes no Hodgkin (LNH) constitueixen un grup heterogeni de neoplàsies originades a partir del creixement descontrolat de diferents cèl·lules que formen el sistema immunològic, concretament els limfòcits (limfòcits B, limfòcits T i cèl·lules Natural Killer (NK)) i els seus precursors. Les neoplàsies de cèl·lules B i T en molts aspectes recapitulen estadis de diferenciació de les cèl·lules B i T normals. Els LNH suposen un 2.8% de tots els càncers i representen el novè càncer més prevalent a Europa (Miranda-Filho, *et al* 2019). Els dos subtipus més freqüents són el limfoma difús de cèl·lules grans B (LDCGB) i el limfoma fol·licular (LF) que en conjunt comprenen pràcticament dos terços de tots els limfomes (Novelli, *et al* 2013).

1.2.- Classificació de les neoplàsies limfoides.

La classificació de les neoplàsies limfoides que utilitzem a l'actualitat és la de l'Organització Mundial de la Salut (OMS) Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. La quarta edició va ser publicada l'any 2008 i l'any 2017 va ser revisada i actualitzada (Swerdlow, *et al* 2017). Els

principis bàsics d'aquesta classificació de l'OMS estan basats en la classificació REAL (Revised European American Lymphoma) publicada per l'International Lymphoma Study Group l'any 1994 (Harris, *et al* 1994). La classificació REAL va representar un nou paradigma a la classificació de les neoplàsies limfoides ja que es focalitzava en la identificació de malalties “reals” en lloc de fer-ho en el marc teòric global utilitzat per la Working Formulation o la diferenciació cel·lular dels sistemes de classificació de Kiel i Lukes-Collins. Hi ha una sèrie de concurrències (immunohistoquímica, genètica, molecular) que han estat claus en l'evolució de la classificació (figura 1).

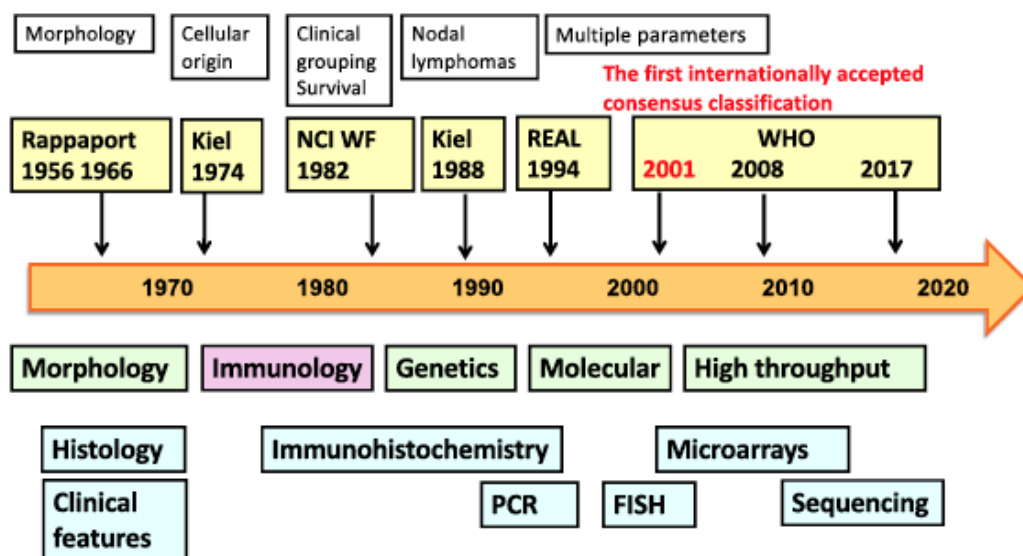


Figura 1.- Evolució de les classificacions de limfomes (de Leval and Jaffe 2020).

No existeix una troballa que sigui el “gold Standard” que ens defineixi cadascuna de les diferents entitats de la classificació. Nogensmenys, el llinatge

és la característica definitiva, i és la base de l'estructura del sistema de classificació en cèl·lules B, cèl·lules T i cèl·lules NK.

A la classificació de l'OMS de 2017 més de 80 limfomes madurs estan reconeguts i agrupats en 3 categories majors: neoplàsies de cèl·lules B, de cèl·lules T i de cèl·lules NK i limfoma de Hodgkin. Hi ha una secció addicional de processos limfoproliferatius associats a immunodeficiència (deficiències primàries, HIV, posttransplantament o altres condicions iatrogèniques).

Classificació de les neoplàsies limfoides (Swerdlow, *et al* 2017)

Neoplàsies de cèl·lules B madures

Leucèmia limfàtica crònica/limfoma limfocític de cèl·lula petita
Limfocitosi B monoclonal*
Leucèmia prolimfocítica de cèl·lules B
Limfoma de la zona marginal esplènica
Tricoleucèmia
Leucèmia/limfoma de cèl·lules B esplènica, no classificable
Limfoma difús de la polpa roja esplènica de cèl·lules B petites
Tricoleucèmia variant
Limfoma limfoplasmacític
Macroglobulinèmia de Waldenström
Gammapatia monoclonal de significat incert, IgM*
Gammapatia monoclonal de significat incert, IgG/IgA*
Malaltia per depòsit d'immunoglobulines monoclonals*
Mieloma de cèl·lules plasmàtiques/plasmocitoma
Limfoma de cèl·lules B extraganglionar de la zona marginal del teixit limfoide associat a mucoses (MALT)
Limfoma de cèl·lules B ganglionar de la zona marginal
Limfoma fol·licular

- Neoplàsia fol·licular In situ*
- Limfoma fol·licular tipus duodenal

Limfoma fol·licular tipus pediàtric*
Limfoma de cèl·lules grans B amb reordenament d'IRF4*
Limfoma cutani primari centre fol·licular
Limfoma de cèl·lules del mantell
Neoplàsia de cèl·lules del mantell In situ
Limfoma difús de cèl·lules grans B (LDCGB), No especificat (NOS)

- Tipus cèl·lula B centre germinal*
- Tipus cèl·lula B activada*

Limfoma de cèl·lules grans B ric amb cèl·lules T/histiòcits
LDCGB primari del sistema nerviós central
LDCGB primari cutani, tipus de les cames

LDCGB Virus Epstein Barr (VEB) positiu*
 Úlcera mucocutània VEB positiva*
 LDCGB associat a inflamació crònica
 Granulomatosi limfomatoide
 Limfoma de cèl·lules grans B primari mediastínic (tímic)
 Limfoma de cèl·lules grans B intravascular
 Limfoma de cèl·lules grans B ALK positiu
 Limfoma plasmablàstic
 Limfoma primari de cavitats
 LDCGB HHV8 positiu, no especificat
 Limfoma de Burkitt
 Limfoma tipu Burkitt amb alteració del 11q*
 Limfoma de cèl·lules B d'alt grau, amb reordenament de *MYC* i *BCL2* i/o *BCL6**
 Limfoma de cèl·lules B d'alt grau, no especificat*
 Limfoma de cèl·lules B, no classificable amb característiques intermitges entre LDCGB i limfoma de Hodgkin clàssic

Neoplàsies de cèl·lules T i NK madures

Leucèmia prolimfocítica T
 Leucèmia de limfòcits T grans granulars
 Desordre limfoproliferatiu crònic de cèl·lules NK
 Leucèmia NK agressiva
 Limfoma T sistèmic de la infància, VEB+*
 Procés limfoproliferatiu tipus Hydroa vacciniforme*
 Leucèmia/Linfoma T de l'adult
 Limfoma extranodal T/NK tipus nasal
 Limfoma T associat a enteropatia
 Limfoma intestinal T, monomòfic epiteliotrópic*
 Procés limfoproliferatiu T indolent del tracte gastrointestinal*
 Limfoma T hepatoesplènic
 Limfoma T tipus paniculitis subcutània
 Micosis fungoide
 Síndrome de Sézary
 Processos limfoproliferatius T primaris cutanis CD30 +
 Papulosi limfomatoide
 Limfoma anaplàstic de cèl·lules grans primari cutani
 Limfoma T primari cutani gamma delta
 Limfoma T primari cutani CD8 epidermotròpic
 Limfoma T primari cutani CD8 acral*
 Procés limfoproliferatiu T primari cutani CD4 de cèl·lula petita/mitjana*
 Limfoma T perifèric, no especificat
 Limfoma T angioimmunoblàstic
 Limfoma T fol·licular*
 Limfoma T perifèric nodal de fenotip fol·licular helper*
 Limfoma T anaplàstic de cèl·lules grans, ALK+
 Limfoma T anaplàstic de cèl·lules grans, ALK-*
 Limfoma T anaplàstic de cèl·lules grans, associat a implant mamari

Limfoma de Hodgkin

Limfoma de Hodgkin predomini limfocític nodular
 Limfoma de Hodgkin clàssic
 Limfoma de Hodgkin clàssic esclerosi nodular

Limfoma de Hodgkin clàssic ric amb limfòcits
Limfoma de Hodgkin clàssic cel·lularitat mixta
Limfoma de Hodgkin clàssic deplecció limfocítica

Processos limfoproliferatius postransplantament (PTLD)

PTLD tipus hiperplàsia plasmacítica
PTLD tipus mononucleosi infecciosa
PTLD tipus hiperplàsia fol·licular florida
PTLD polimòrfic
PTLD monomòrfic (tipus cèl·lula B, T i NK)
PTLD tipus limfoma de Hodgkin clàssic

Neoplàsies de cèl·lules dendrítiques i histiocítiques

Sarcoma histiocític
Histiocitosi de cèl·lules de Langerhans
Tumor de cèl·lules dendrítiques indeterminades
Sarcoma de cèl·lules dendrítiques interdigitants
Sarcoma de cèl·lules dendrítiques fol·liculars
Tumor de cèl·lules reticulars fibroblàstic
Xantogranuloma juvenil disseminat
Malaltia d'Erdheim-Chester*

* Canvis realitzats a l'última revisió respecte a la classificació del 2008

El diagnòstic acurat de les neoplàsies limfoides requereix la integració de les dades clíniques, morfològiques, immunofenotípiques i genètiques. L'obtenció de les dades clíniques és una part clau en el procés diagnòstic.

2.- Limfomes cutanis.

L'afectació cutània per part dels limfomes és heterogènia i presenten variacions en la presentació clínica, la histologia, l'immunofenotip i el pronòstic. En el moment de la presentació clínica, els limfomes cutanis poden ser primaris o poden infiltrar la pell com una afectació secundària.

Quant a la histologia, en moltes ocasions, els limfomes primaris cutanis són diferents dels limfomes que morfològicament són similars i que es presenten a nivell dels ganglis limfàtics i afecten la pell de forma secundària.

Des del punt de vista biològic, també trobem diferències a nivell immunohistoquímic i de biologia molecular: per exemple el limfoma difús de cèl·lules grans primari cutani, tipus de les cames i el limfoma de la zona marginal primari cutani presenten diferents perfils mutacionals dels limfomes sistèmics homòlegs (Mareschal, *et al* 2017, Maurus, *et al* 2018).

Per últim, però no menys important, el pronòstic entre els limfomes cutanis primaris i l'afectació secundària també és diferent. La història natural dels primaris cutanis sol ser més indolent que la dels nodals i és per aquesta raó que requereixen una aproximació terapèutica diferent.

A més, per molts tipus de limfomes, el lloc de presentació pot ser una indicació de diferències biològiques subjacents. Nogensmenys, estudis genètics han demostrat lligams entre limfomes en diferent localització anatòmica. Per tant, esquemes i classificacions òrgan específiques poden impedir la comprensió

d'aquests mecanismes patogenètics comuns. A més, és molt important que dermatòlegs, hematòlegs i patòlegs parlin un llenguatge comú. Aquest llenguatge comú va veure's culminat amb la publicació l'any 2005 de la classificació OMS-European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) (Willemze, *et al* 2005). La forma d'encarar la classificació dels limfomes cutanis va estar un desafiament per les demandes competitives entre els que preferien aquesta aproximació òrgan específic versus els que preferien entendre millor les troballes comuns dels limfomes que afecten diferents localitzacions anatòmiques. La col·laboració entre hematopatòlegs i dermatopatòlegs va millorar el nostre coneixement i comprensió dels limfomes cutanis. El reconeixement dels limfomes òrgan específic, particularment els cutanis, va representar un dels més grans avanços en la classificació de l'OMS de 2008. A l'actual revisió de 2017 es van reconèixer 30 limfomes basats en l'òrgan com a entitats provisionals o entitats definides, 13 de les quals (43.3%) són processos limfoproliferatius primaris cutanis (Swerdlow, *et al* 2017).

El que sí que resulta imprescindible és el coneixement de la clínica per poder arribar a un diagnòstic específic. Així per exemple un cas de Micosis fungoides transformada amb nombroses cèl·lules CD30 pot ser indistingible histològicament d'un procés limfoproliferatiu de cèl·lula T CD30 positiu primari cutani. El tractament és radicalment diferent, pel que el patòleg que ha de realitzar el diagnòstic dels casos que afecten la pell ha de tenir coneixement o estar en estret contacte amb el dermatòleg que tracta al pacient clínicament (Gru and Jaffe 2017b).

2.1.- Classificació OMS-EORTC 2018(Willemze, *et al* 2019)

Limfomes cutanis de cèl·lules T

Micosis fungoides

Variants de Micosis fungoides

Micosis fungoides fol·liculotropa

Reticulosis pagetoide

Granulomatosis slack skin

Síndrome de Sézary

Limfoma/leucèmia de cèl·lules T de l'adult

Processos limfoproliferatius CD30+ primaris cutanis

Limfoma anaplàstic de cèl·lules grans primari cutani

Papulosi limfomatoide

Limfoma de cèl·lules T tipus panniculitis subcutània

Limfoma extranodal de cèl·lules T/NK, tipus nasal

Infecció EBV crònica i activa

Limfoma T perifèric primari cutani, subtipus rars

Limfoma T primari cutani gamma delta

Limfoma T primari cutani CD8 epidermotròpic*

Limfoma T primari cutani CD8 acral*

Procés limfoproliferatiu T primari cutani CD4 de cèl·lula petita/mitjana*

Limfoma T perifèric primari cutani, NOS

Limfoma cutani de cèl·lules B

Limfoma de la zona marginal primari cutani

Limfoma fol·licular primari cutani

Limfoma B de cèl·lules grans primari cutani tipus de les cames

Úlcera mucocutània EBV+*

Limfoma B de cèl·lula gran intravascular

* Entitats provisionals

3.- Limfoma fol·licular (LF).

3.1.- Epidemiologia

El LF és el segon subtipus més freqüent de limfoma no Hodgkin a Europa occidental i representa entre el 20 i el 30% de tots ells (Swerdlow, *et al* 2017). La incidència anual d'aquesta malaltia s'ha incrementat substancialment durant les últimes dècades augmentant de 2-3 casos/100.000 habitants en 1950 a 5-7/100.000 habitants en 2009 (Dreyling, *et al* 2014). A Espanya es diagnostiquen entre 3000 i 5000 nous casos cada any, de manera que s'ha convertit en el segon tumor limfoide més comú després del LDCGB. El LF és un limfoma de curs indolent. Afecta predominantment a adults amb una mediana d'edat de 60 anys i rarament es veu en individus menors de 20 anys. Nogensmenys, en els últims anys s'ha descrit una forma pediàtrica, l'anomenat limfoma fol·licular de tipus pediàtric que a l'edició revisada de la classificació de la OMS de 2017 és ja una entitat definitiva (Swerdlow, *et al* 2017).

3.2.- Histologia

El LF es caracteritza per una proliferació clonal de cèl·lules limfoides neoplàstiques que mostren característiques morfològiques, immunofenotípiques i moleculars de les cèl·lules del centre germinal de les que s'origina (Lackraj, *et al* 2018). Histològicament està constituït per centròcits i

centroblastes, i sol mostrar un patró de creixement fol·licular. El LF també pot mostrar un patró de creixement mixte amb un 25-75% de component fol·licular i àrees de creixement difús o un patró predominantment difús (<25% de patró fol·licular) (Swerdlow, *et al* 2017). Les cèl·lules tumorals presenten positivitat per a antígens de línia B (CD20 i CD79a), immunoglobulines de superfície, i marcadors de centre germinal (bcl2, bcl6 i CD10). Característicament la proteïna bcl2 s'expressa de forma uniforme als fol·licles tumorals i ens permet diferenciar-ho dels fol·licles limfoides normals residuals que són negatius. Dins d'aquests fol·licles neoplàstics s'observen xarxes de cèl·lules dendrítiques fol·liculars, així com altres cèl·lules no tumorals (macròfags, diferents subtipus de cèl·lules T i histiòcits) que conformen el microambient que acompanya el limfoma.

L'OMS classifica el LF en funció del nombre de centroblasts per camp de gran augment quantificant 10 fol·licles neoplàstics representatius. Es consideren tres graus, 1, 2 i 3: grau 1, 0-5 centroblastes; grau 2, 6-15 centroblastes, grau 3, >15 centroblastes. El grau 3 es subdivideix en grau 3A (>15 centroblastes amb presència de centròcits) i grau 3B (llençols de centroblastes sense centròcits)(Swerdlow, *et al* 2017). El FL grau 3 és el menys freqüent i suposa entre el 20-25% dels casos segons la sèrie analitzada (Swerdlow, *et al* 2017). Des d'un punt de vista histològic, es poden identificar àrees difuses al 60-80% dels casos classificats com grau 3, que en base a la revisió actual de la classificació de l'OMS s'han de diagnosticar com LDCGB (indicar %) i FL (indicar %) (Swerdlow, *et al* 2017). Estudis citogenètics i moleculars han suggerit que els graus 1, 2 i 3A formen un espectre biològic similar, mentre que

el grau 3B està més relacionat amb el LDCGB *de novo* (Mercadal, et al 2020) (Ott, et al 2002).

3.3.- Variants de LF.

3.3.1.- Neoplàsia fol·licular "in situ".

Es caracteritza per presentar un fol·licles anormals, clonals en un gangli que arquitecturalment és normal. Aquests fol·licles tenen un immunofenotip típic de limfoma fol·licular, amb expressió intensa de CD10 i de bcl2. El nombre de fol·licles afectats varia de cas a cas, però típicament no tots els fol·licles dels gangli limfàtic estan afectats (Cong, et al 2002).

El reordenament de BCL2 per FISH es detecta en la majoria dels casos, sobretot quan se selecciona el centre afectat per immunohistoquímica.

Els casos d'in situ són poc complexos genèticament (Schmidt, et al 2014), quan s'avalua el copy number per hibridació genòmica comparativa (CGH), en comparació amb el limfoma fol·licular establert.

La neoplàsia fol·licular in situ s'ha de distingir de l'afectació parcial per un limfoma fol·licular, on l'arquitectura està distorsionada focalment, per la presència de fol·licles grans i monòtons. Aquests casos progressen més freqüentment a limfoma fol·licular, que l'in situ, que ho sol fer en un 6% dels casos.

3.3.2.- Limfoma fol·licular tipus duodenal.

El limfoma fol·licular del tracte gastrointestinal és poc freqüent. A la nova classificació de l'OMS de 2017 ha estat reconegut com una entitat reconeguda i anomenat LF de tipus duodenal(Swerdlow, *et al* 2017). El duodè és la porció del budell prim que s'afecta més freqüentment (Misdraji, *et al* 2011).

La malaltia està típicament localitzada.

Histològicament tenen un fenotip similar al descrit a l'in situ i com el limfoma fol·licular establert, amb positivitat a CD10 i bcl2. El reordenament de BCL2 és detecta a la majoria dels casos.

De forma similar als casos d'in situ, el nombre d'alteracions genètiques, comparat amb un LF establert és baix(Nann, *et al* 2020, Schmidt, *et al* 2014).

3.3.3.- Limfoma fol·licular extranodal.

La major part de casos de LF apareix al gangli limfàtic. L'afectació extranodal és poc freqüent. D'entre les localitzacions més freqüents tenim la pell, el tracte gastrointestinal i d'altres localitzacions com l'anell de Waldeyer, testicle, annexes oculars, glàndules salivals, tiroides, vesícula biliar (Mani, *et al* 2010) o tracte genital femení.

De forma general, els limfomes fol·liculars extranodals solen presentar-se amb malaltia localitzada, no solen expressar bcl2 ni tenir la translocació de BCL2 i el pronòstic sol ser millor que el del LF nodal (Goodlad, *et al* 2004).

3.3.4.- Limfoma fol·licular a la pell.

El LF primari cutani representa aproximadament el 10% de tots els limfomes cutanis i és el tipus més comú de limfoma B primari cutani que té una predilecció pel cuir pilós, front i part superior del tronc (Willemze, *et al* 2005). Les lesions solen ser úniques i en forma de nòdul, encara que lesions satèl·lits són comuns. Solen afectar adults d'edat mitja.

Histològicament l'infiltrat es localitza a dermis superficial, deixant una zona de grenz intacta. El patró d'infiltració pot ser fol·licular, fol·licular i difús i de vegades difús. El patró de creixement difús, sense un patró morfològic nodular o fol·licular, ha estat descrit com un dels patrons més freqüents (Senff, *et al* 2007). En aquests casos a la perifèria de la lesió sol haver estructures fol·liculars, que poden representar fol·licles reactius o neoplàstics (Hope and Pincus 2017). Citològicament estan constituïts per centròcits i centroblastes, acompanyats de limfòcits petits. Ocasionalment les cèl·lules neoplàstiques poden tenir una morfologia fusiforme (Goodlad 2001). Llençols de centroblastes sense centròcits i amb necrosi, no formen part dels limfomes fol·liculars primaris cutanis si no que haurien de classificar-se com limfoma B difús de cèl·lula gran primari cutani (Swerdlow, *et al* 2017). El patró de creixement fol·licular sol veure's afectant el dermis superficial i profund i de vegades arribant a hipodermis. Els fol·licles poden ser no ben desenvolupats, grans,

irregulars de forma, sense mantells ben formats. Els macròfags de cos tingible solen estar absents però de vegades s'observen aïllats macròfags dins dels fol·licles neoplàstics (Cerroni, *et al* 2000).

Immunohistoquímicament les cèl·lules expressen marcadors B, CD20, CD79a i PAX-5, i són positius a Bcl-6, un marcador de centre germinal, però solen ser negatius a CD10 i Bcl-2 (Willemze, *et al* 2019). Bcl-6 és positiu dins del fol·licles neoplàstics i també a limfòcits B situats en petits níus a la zona interfol·licular i per fora de les zones amb xarxa de dendrítiques positives a CD21. Aquesta troballa és molt suggestiva de limfoma fol·licular. Ki67 és una tècnica que pot ajudar també al diagnòstic diferencial entre el limfoma fol·licular i la hiperplàsia reactiva o el limfoma b de la zona marginal on els centres germinals tenen un índex proliferatiu molt alt, de més del 90%. Aquests fol·licles neoplàstics solen tenir un índex proliferatiu menor del 50%.

La troballa genètica que defineix el limfoma fol·licular nodal és la t(14;18), que es sol veure en més del 90% de casos de grau 1-2 (Swerdlow, *et al* 2017). En contrast, els primaris cutanis no solen presentar el reordenament de BCL2 per hibridació in situ fluorescent (FISH).

El diagnòstic d'un limfoma fol·licular primari cutani requereix un estadiatge negatiu per excloure l'afectació extracutània. L'estadiatge recomanat és una analítica completa, estudis d'imatge i una biòpsia de medul·la òssia (Senff, *et al* 2008a).

Els LF primaris cutanis tenen un pronòstic excel·lent. La majoria dels casos es presenten amb una sola lesió cutània i poden ser tractats amb tractament local, cirurgia o radioteràpia. Les recaigudes després del tractament inicial del cas

solen aparèixer en un 30% dels pacients, mentre que l'extensió més enllà de la pell s'ha descrit en un 10% dels casos (Senff, *et al* 2007).

És molt important distingir els casos primaris de l'afectació secundària per una LF sistèmic, ja que clínicament i histopatològicament poder ser molt similars i el maneig, tractament i pronòstic del malalt és molt diferent.

A més, plantegen diagnòstic diferencial amb hiperplàsia limfoide cutània reactiva, amb limfoma B de la zona marginal i amb el limfoma B difús de cèl·lula gran primari cutani, tipus de les cames.

La hiperplàsia limfoide cutània reactiva està descrita en front de múltiples gatells com són picades d'artròpods, tatuatges, injeccions, drogues, etc. Histològicament es veuen fol·licles ben formats amb mantells preservats. La proliferació B està limitada als fol·licles i el fenotip és de centres germinals reactius.

El limfoma B de la zona marginal presenta fol·licles residuals, reactius, atròfics o colonitzats i envoltats de la població neoplàstica, les cèl·lules monocitoides que solen tenir diferenciació plasmacítica i acompanyar-se d'un infiltrat de cèl·lules plasmàtiques a la perifèria de la lesió. La restricció de cadenes lleugeres a les cèl·lules plasmàtiques és molt freqüent al marginal i excepcional al fol·licular primari cutani, encara que està descrit a la literatura (Skala, *et al* 2020).

El limfoma B difús de cèl·lula gran, tipus de les cames presenta diagnòstic diferencial amb el fol·licular primari cutani quan aquest té un patró de creixement difús. La clau diagnòstica es troba amb el tipus de cèl·lula. Al

fol·licular la cèl·lula predominant és la petita, el centròcit i per suposat el fenotip. El primari fol·licular sol ser negatiu per bcl-2, MUM1, FOXP-1 i IgM.

4.- Limfoma de cèl·lules T/NK extranodal, tipus nasal (LCTNKE).

4.1.- Epidemiologia i manifestacions clíniques.

El LCTNKE és considerat el prototip dels limfomes de cèl·lules T/NK determinats pel Virus D'Epstein Barr (VEB). És un limfoma extranodal de cèl·lules NK, predominantment, i de cèl·lules T menys freqüentment. Les cèl·lules NK són part del sistema immune innat i resideixen predominantment a les localitzacions extranodals on proliferen ràpidament en resposta a antígens sense una sensibilització inicial (Sun and Lanier 2011). La funció normal de les cèl·lules NK i la seva distribució poden explicar perquè aquest limfoma és de predomini extranodal i és una malaltia agressiva. És més prevalent en determinades àrees geogràfiques com Àsia (especialment zones del Sudest Asiàtic com Japó, Taiwan, Xina, Corea, Tailàndia i Hong Kong), Amèrica Central (Guatemala i Mèxic) i Sudamèrica (Perú i Brasil). Constitueix aproximadament el 3-10% de tots els limfomes al Sudest Asiàtic, al voltant del 6% a Amèrica Llatina i menys de l'1% als països occidentals (Au, *et al* 2009).

El LCTNKE presenta una associació invariable amb la infecció del VEB, independentment de l'origen del pacient, el que indica un paper patogènic directe del virus en la limfomagènesi. El VEB es troba en una forma episomal

clonal i freqüentment mostra una deleció de 30 parells de bases en el gen que codifica LMP-1 (Kuo, *et al* 2004). Estudis a la literatura mostren que el VEB a l'Àsia és el subtipus A i a Europa i Estats Units, del subtipus B (Chen, *et al* 1992).

Sol afectar a pacients adults (50-70 anys) i és més comú en homes que en dones.

La localització de presentació més freqüent és el tracte aerodigestiu superior (cavitat nasal, nasofaringe, sins paranasals i paladar). Aproximadament 20% dels casos es presenten fóra de la regió nasal, sent la pell la localització més freqüent (aproximadament 10% dels casos). Les lesions de la pell es troben típicament a les cames o al tronc (Gru and Jaffe 2017a). Molts pacients que es presenten amb localitzacions "primàries" extranasals tenen ocult el limfoma a la cavitat nasal (Au, *et al* 2009).

La forma característica amb afectació nasal inicial, consisteix en un tumor centrefacial molt destructiu (d'aquí la clàssica denominació de granuloma letal de la línia mitja) amb tendència a la ulceració. En aquest cas l'afectació cutània seria per infiltració secundària del limfoma originat en la mucosa nasal, produint la destrucció ràpida de la pell del nas i dels teixits subjacents. Així mateix, pot ocasionar perforació del paladar, així com infiltració de l'òrbita, glàndules salivars i sinus paranasals. També pot cursar amb epistaxis, rinorrea i oclusió nasal.

Quan les lesions apareixen inicialment a la pell fóra de l'àrea nasal, s'observen plaques, nòduls o tumors, eritemato-violacis i únics o habitualment múltiples, localitzats preferentment al tronc i les extremitats (Al-Hakeem, *et al* 2007).

També en aquestes localitzacions la ulceració s'observa amb freqüència (>20% dels casos).

De vegades els pacients refereixen simptomatologia general com astènia, anorèxia o febre. Ocasionalment pot complicar-se amb l'aparició d'una síndrome hemofagocítica (Al-Hakeem, *et al* 2007, Chang, *et al* 2003).

La disseminació a òrgans interns com ganglis limfàtics, medul·la òssia, melsa, tracte gastrointestinal, testicle i pulmons és freqüent (Tse, *et al* 2019).

4.2.- Histopatologia, fenotip i diagnòstic diferencial.

Las biòpsies mostren un espectre morfològic ampli, des de casos que simulen processos inflamatoris reactius a casos molt pleomòrfics amb angiocentricitat i angiodestrucció, que comporta necrosi i ulceració. A les mucoses i a la pell poden veure's canvis d'hiperplàsia pseudoepiteliomatosa. La infiltració cutània sol ser multifocal, amb afectació de dermis e hipodermis. L'epidermotropisme focal pot veure's, sense que s'identifiqui migració pagetoide amb formació de microabscessos de Pautrier. Quan el teixit adipós es troba afectat, pot observar-se necrosi i rimming dels adipòcits per les cèl·lules malignes. La dada més destacable és la tendència a l'angiocentricitat (Geller, *et al* 2018). Les cèl·lules neoplàstiques poden ser petites i pràcticament sense atípia o grans, pleomòrfiques amb marcada atípia.

L'estudi immunohistoquímic mostra que les cèl·lules neoplàstiques són per definició EBV positives. EBV es demostra en pràcticament tots els casos amb la tècnica de hibridació in situ (EBERs) (Swerdlow, *et al* 2017).

En un 80-85% dels casos són de fenotip NK amb expressió de CD3 ϵ +, CD2+, CD56+ i expressen molècules citotòxiques (TIA-1, granzyme B, perforin) (Jaffe 1996, Quintanilla-Martinez, *et al* 1999). No expressen marcadors de superfície de cèl·lules T (CD3, CD4, CD8 i CD5). CD56 és positiu a la majoria dels casos però en els que és negatiu, el diagnòstic d'un cas de fenotip NK s'ha de fonamentar en la positivitat a marcadors citotòxics i al virus d'EBV (Willemze, *et al* 2005). El 15-20% dels casos restants, són de fenotip T i expressen CD3, CD8, CD5, molècules citotòxiques, CD56 i el receptor de cèl·lula T $\alpha\beta$ o $\gamma\delta$. CD30 s'expressa en un percentatge dels casos que pot oscil·lar entre un 30-40%, sobretot en els casos de morfologia de cèl·lula gran i anaplàstica (Kim, *et al* 2015).

Els casos de fenotip T mostren reordenament monoclonal del gen del receptor de cèl·lules T (TCR) (Pongpruttipan, *et al* 2012). Els derivats de cèl·lules NK no mostren reordenaments clonals del TCR ni de les cadenes pesades de les immunoglobulines (IgH). Aproximadament el 85% dels casos de LTNKE nasals són d'origen NK, mentre que només el 50% dels extranasals son derivats de cèl·lules NK. A més, a part dels estudis de reordenament del TCR, l'estudi immunohistoquímic per BF1 i TCR $\gamma\delta$ pot ajudar-nos a distingir si es tracta d'una cèl·lula d'origen T o NK.

En els últims anys s'han descrit mutacions somàtiques recurrents a DDX3X, a la via de senyalització JAK-STAT (STAT3, JAK3, STAT5B), en gens supressors

tumorals (TP53, BCOR, MGA, PRDM1, FOXO3, HACE1), oncogens (RAS, MYC), en modificadors epigenètics (KMT2D, MLL2, ARID1A, EP300) i gens relacionats amb regulació del cicle cel·lular i apoptosi (CDKN2A, CDKN2B, CDKN1A, FAS) (Dobashi, *et al* 2016, Lee, *et al* 2015).

El diagnòstic diferencial del LTNKE a la pell inclou altres tipus de limfoma cutani agressiu. El limfoma T $\gamma\delta$ primari cutani sol ser CD56+ i normalment perd expressió de CD5, CD4 i CD8. Amb tot, l'epidermotropisme sol ser més freqüent i les cèl·lules expressen de forma intensa el TCR $\gamma\delta$ i EBERs sol ser negatiu. Els casos de Micosis fungoides tenen una infiltració cutània diferent amb marcat epidermotropisme i CD56 rarament és positiu. Els processos limfoproliferatius tipus hidroavacciniforme i la neoplàsia de cèl·lules dendrítiques plasmocitoides blàstica també presenten diagnòstic diferencial. La presentació clínica i el fenotip ens ajudarien a distingir-ho. El procés limfoproliferatiu tipus hidroavacciniforme sol afectar nens. La neoplàsia de cèl·lules dendrítiques blàstiques plasmocitoides, encara que característicament són CD56+, no solen presentar angiocentricitat i a més expressen marcadors com CD123 i TCL-1 i són negatius a CD3 i EBV (Gru and Jaffe 2017a).

III.- HIPÒTESI

Durant els últims anys la integració de la morfologia, la clínica, l'immunofenotip i les troballes moleculars han permès definir entitats i arribar a un consens en el diagnòstic del limfoma cutani.

La hipòtesi de treball dels projectes que formen aquesta tesi doctoral poden sintetitzar-se en els següents punts:

1.- Existeixen uns limfomes que afecten principalment la pell, i tenen característiques que els fa diferents dels seus homòlegs nodals o sistèmics. La presentació clínica sol ser similar, en canvi les característiques histològiques i moleculars ens poden ajudar a distingir si es tracta d'una afectació primària o secundària. Això és molt evident en el limfoma fol·licular, que quan és un primari cutani, és un limfoma molt indolent amb un risc molt baix de disseminar-se més enllà de la pell, en canvi quan és una afectació secundària és una malaltia disseminada amb un pronòstic i un tractament radicalment diferent.

Les diferències en el fenotip i l'estudi de reordenament de BCL2 no queden clares a la literatura, perquè les sèries són curtes i no es focalitzen en aquest punt. Nosaltres hipotitzem que l'estudi d'una sèrie amplia de casos podria ajudar a definir els criteris que ens aclaririen aquest diagnòstic diferencial.

2.- El LTNKE és un limfoma agressiu extranodal amb afectació cutània en el 10% dels casos. La presentació clínica a la pell pot ser molt variada i presentar

un diagnòstic diferencial molt ampli. Histològicament són limfomes constituïts per limfòcits de mida mitjana-gran. A les àrees endèmiques s'han descrit casos amb cèl·lules més petites. A Europa i Estats Units on això no està descrit, els casos amb limfòcits petits poden suposar un repte i una dificultat diagnòstica que fan endarrerir el diagnòstic d'aquesta malaltia.

Per això, la nostra hipòtesi és estudiar una sèrie de casos de LTNKE de cèl·lula petita amb afectació nasal i extranasal, incloent afectació cutània, per tal d'identificar les característiques que ens ajudin al reconeixement oportú i més d'hora, d'aquests casos fóra de les zones endèmiques i en territoris extranasals com la pell.

IV.- OBJECTIUS

Objectiu general

L'objectiu principal d'aquesta tesi es la identificació de factors clínico-patològics fenotípics i moleculars que ens permetin diferenciar entre determinats limfomes cutanis primaris i l'afectació cutània secundària dels seus equivalents sistèmics.

Objectius específics:

Primer treball:

Realitzar un estudi clinicopatològic i genètic en una sèrie llarga de pacients amb limfoma fol·licular d'afectació primària i secundària per tal d'avaluar el significat i utilitat dels paràmetres diagnòstics proposats (dades clíniques, dades patològiques (expressió immunohistoquímica de bcl2 i CD10) i dades genètiques (reordenament de BCL2).

Segon treball:

Realitzar un estudi clinicopatològic dels casos de LCTNKE amb predomini de cèl·lula petita en una sèrie de pacients d'Estats Units i Europa, amb l'objectiu d'identificar característiques que ens ajudin a reconèixer d'hora els casos en zones no endèmiques.

V.- PACIENTS, MÈTODES I RESULTATS

ORIGINAL ARTICLE

Primary cutaneous vs secondary cutaneous follicular lymphomas: A comparative study focused on BCL2, CD10, and t(14;18) expression

Octavio Servitje^{1*} | Fina Climent^{2*} | Lluís Colomo³ | Nuria Ruiz² |
 Adriana García-Herrera⁴ | Fernando Gallardo⁵ | Santiago Mercadal⁶ | Helena Pomares⁶ |
 Cristina Muniesa¹ | Clara Martín-Callizo¹ | Joaquim Marcoval¹ | Roger Rovira⁵ |
 Teresa Estrach⁷ | Ramon M. Pujol⁵

¹Department of Dermatology, Hospital Universitari de Bellvitge. IDIBELL. Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

²Department of Pathology, Hospital Universitari de Bellvitge. IDIBELL. Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

³Department of Pathology, Hospital del Mar. Parc de Salut Mar. IMIM, Barcelona, Spain

⁴Department of Pathology, Hospital Clínic. IDIBAPS. Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

⁵Department of Dermatology, Hospital del Mar. Parc de Salut Mar. IMIM, Barcelona, Spain

⁶Department of Hematology, Catalan Institute of Oncology. Hospital Duran i Reynals. IDIBELL. Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

⁷Department of Dermatology, Hospital Clínic. IDIBAPS. Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

Correspondence

Ramon M. Pujol, MD, PhD., Department of Dermatology, Hospital del Mar. Parc de Salut Mar., Passeig Marítim 25-29, 08003 Barcelona, Spain.
 Email: rpujol@parcdesalutmar.cat

Background: Primary cutaneous follicular center-cell lymphoma (PCFCL) is one of the most common types of cutaneous B-cell lymphoma. Differences in immunohistochemical expression of BCL2 and CD10 antigens along with the presence of t(14;18) translocation in neoplastic cells have been postulated as relevant clues in differentiating PCFCL from cutaneous lesions secondary to a systemic follicular lymphoma (SCFL). The aim of this study is to evaluate the significance and usefulness of these parameters in a large series of patients.

Methods: Patients with PCFCL and SCFL diagnosed at three university hospitals in Barcelona, from 2000 to 2015 were reviewed. Clinical, histopathological, immunophenotypical, genetic, and outcome parameters were analyzed.

Results: Eighty-one cases (59 PCFCL and 22 SCFL) were included. There were no significant differences between PCFCL and SCFL cases regarding clinical presentation, site of involvement, or predominant type of skin lesions. Most patients in both groups showed positivity for BCL2 and CD10, but strong expression of BCL2 and CD10 was associated with SCFL cases. Although more frequent in SCFL, a small proportion of PCFCL cases also showed the t(14;18) on FISH analysis.

Conclusion: The intensity of BCL2 expression was found to be the single most valuable clue in differentiating PCFCL from SCFL cases on histopathological grounds.

KEYWORDS

B-cell cutaneous lymphoma, BCL2, CD10, primary cutaneous follicle center-cell lymphoma, t(14;18)

1 | INTRODUCTION

Primary cutaneous follicular center-cell lymphoma (PCFCL) is one of the main subtypes of primary cutaneous B-cell lymphomas.^{1,2} It is usually manifested by solitary or grouped plaques and tumors

most often involving the head and neck or trunk areas. In contrast to systemic follicular lymphomas, PCFCLs usually run an indolent clinical evolution, and their treatment is based on skin-directed therapies. An important issue regarding PCFCL patients' management is their differentiation from the skin involvement by systemic follicular lymphomas (secondary cutaneous follicular lymphomas [SCFLs]). In this particular setting, skin lesions of both disorders can

*Octavio Servitje and Fina Climent contributed the same in the study

be clinically and histopathologically very similar, if not identical, and although in most patients with SCFL, systemic involvement can be shown at the time of diagnosis, in some cases, skin lesions can be present before nodal or systemic disease become evident. Early studies pointed out that differences in BCL2 and CD10 expression and the presence of t(14:18) translocation in neoplastic cells are important clues in differentiating primary cutaneous from systemic follicular lymphomas.^{1,2} Thus, in contrast to systemic follicular lymphomas, PCFCLs were said to be mostly negative for BCL2 and CD10, and the presence of t(14:18) to be virtually negative. However, some recent studies have reported BCL2 positivity rates among PCFCLs ranging from 0% to 86% of cases,³⁻⁷ and a variable number of cases presenting the t(14:18) translocation have also been reported.⁸⁻¹⁰ In addition, the significance of such results remains controversial because the number of studies focusing on this issue is scarce and usually included small numbers of patients. In order to evaluate the significance and usefulness of the proposed diagnostic parameters, we have performed a comparative clinicopathological and genetic study of a large series of patients with PCFCL and SCFL.

2 | MATERIAL AND METHODS

2.1 | Design of the study

After informed consent, records of PCFCL and SCFL diagnosed between 2000 and 2015 at three university hospitals in Barcelona (Spain) were retrospectively reviewed. The diagnosis of PCFCL was established on the basis of the standard criteria and after a complete staging procedure including thoracoabdominal scan or positron emission tomography (PET)-scan and bone marrow examination was performed.

The clinical information was combined with clinical pictures and included in a specific data base. Following a systematized protocol, a number of clinical variables including age at diagnosis, gender, site/s of skin involvement, type of predominant lesions, initial treatment, response to treatment, relapses, and outcome were recorded.

A systematic evaluation of histopathological features was performed by a panel of expert dermatopathologists, using the criteria of the World Health Organization (WHO) classification. Standard methods for tissue fixation and processing, as well as automated immunostaining, were used by the participating centers. Antibodies against the following antigens were used: CD20, CD3, CD5, CD10, BCL2, BCL6, CD21, kappa, lambda, CD30, and Ki-67. The following variables were blindly analyzed: pattern of infiltration, predominant cell type, depth of infiltration, CD10, BCL2, and BCL6 expression using a cutoff of 30%, and the presence of the translocation t(14:18) by fluorescence in situ hybridization (FISH) using a dual fusion *IGH/BCL2* gene probe, evaluated as previously.¹¹ As the evaluation of BCL2 protein expression is challenging because of the presence of numerous reactive T-cells that normally express BCL2 protein, the staining intensity was evaluated semiquantitatively into three categories: negative, weakly positive, or strongly positive (similar to reactive T-cells), as suggested by the Lymphoma

TABLE 1 Clinical features of PCFCL vs SCFL

Clinical variables	PCFCL, N = 59	SCFL, N = 22
Age, mean (range)	57 (21-88)	65 (53-83)
Male sex	40 (68)	9 (41)
Site of skin involvement		
Face and neck	17 (29)	8 (36)
Trunk	23 (39)	4 (18)
Upper extremities	3 (5)	2 (9)
Low extremities	3 (5)	3 (14)
Scalp	13 (22)	5 (23)
Type of predominant lesions		
Papules	2 (3)	1 (5)
Plaques	10 (17)	1 (5)
Nodules	30 (51)	12 (57)
Tumors	17 (29)	7 (33)
Initial treatment		
Surgery	20 (34)	
Radiotherapy	25 (42)	
Chemotherapy ^a	4 (7)	22 (100)
Surgery + radiotherapy	1 (2)	
Rituximab monotherapy ^b	9 (15)	
Response to treatment		
CR	45 (76)	12 (55)
PR	11 (19)	3 (14)
SD	3 (5)	4 (18)
Progression	0 (0.0)	3 (14)
Relapses		
No	33 (60)	6 (29)
Yes	22 (40)	15 (71)
Extracutaneous involvement		
No	54 (92)	0 (0)
Yes	5 (9)	22 (100)
Outcome		
Alive	55 (93)	13 (59)
Dead	4 (7)	9 (41)
Status		
Alive free disease	44 (75)	7 (32)
Alive with disease	11 (19)	6 (27)
Died of lymphoma	1 (2)	7 (32)
Died of other causes	3 (5)	2 (9)

Abbreviations: PCFCL, primary cutaneous follicular center-cell lymphoma; SCFL, secondary cutaneous follicular lymphoma; CR, complete response; PR, partial response; SD, stable disease.

Values are presented as number (%) unless otherwise indicated.

^a Chemotherapy means: rituximab-CHOP; rituximab-bendamustine or rituximab-fludarabine. Among SCFLs, chemotherapy was associated to surgery (two cases) or RDT (three cases).

^b Rituximab was administered intralesional or i.v.

Biomarker Consortium.¹² Thus, staining intensity was scored as weaker than internal hyphenate, and equal or stronger than internal T-cells. For CD10 staining, we compared protein staining with internal staining of granulocytes and dermal fibroblasts, as well as external controls of CD10 observed in tonsil sections. Therefore, we scored CD10 as weaker than controls for the marker, or strong for equal or stronger than controls.

2.2 | Statistical analysis

Descriptive statistical analysis, contingency tables, and χ^2 tests were performed. Descriptive statistics are presented as means, medians, and ranges for continuous variables, and as frequencies and percentages for categorical variables. Differences among the groups of patients and variable distribution were compared using the χ^2 test (two tailed) for semiquantitative variable or non-parametric tests when necessary. *P* values <0.05 were considered statistically significant.

3 | RESULTS

A total of 81 patients were included in the study. Among them, 59 corresponded to PCFCL and 22 to SCFL. Among the 22 SCFL cases, skin lesions were the first clinical manifestation of the disease in 12 (54%). In these patients, systemic involvement was detected after staging work. Bone marrow biopsy was performed in all secondary cases (22), and it was positive in nine. Among the primary cutaneous group, it

was performed in 35 out of 59 cases, and it was negative in all of them. Mean follow-up was 49 months (12-214) in PCFCLs and 57 months (14-181) in the SCFL group.

3.1 | Clinical features

The observed clinical features in both groups of patients are summarized in Table 1. No statistically significant differences among the two groups were detected. Mean age at diagnosis was 57 years for patients with PCFCL and 65 years in SCFL cases. Sex distribution showed a slight predominance for male gender in the primary group vs the secondary cases (68% vs 41%) (not statistically significant). In both groups, nodulotumoral skin lesions were the most common clinical presentation (Figure 1). In PCFCL, the trunk was the main involved location (39%), followed by the face and neck (29%) and scalp (22%), whereas in SCFL cases, trunk involvement was less frequently seen (18%). Among the 59 PCFL cases, 31(52%) presented with single cutaneous lesions (T1), 21 (35%) with anatomically localized lesions (T2), and 7 (11%) with multifocal lesions (T3).



FIGURE 1 Clinical images of patients with primary cutaneous follicular center-cell lymphoma (PCFCL) and secondary cutaneous follicular lymphoma (SCFL): A, C, and E correspond to typical skin lesions of PCFCL affecting the scalp, back, and extremities; B, D, and F showed similar skin lesions in patients with SCFL. In these three patients, systemic follicular lymphoma was shown after staging

In the group of PCFCLs, radiotherapy was the most common initial treatment (42%) followed by surgery (34%). After these procedures, 45 patients (76%) achieved a complete remission, 11 (19%) had a partial remission, and 3 (5%) achieved stable disease. In the three cases with initial involvement of the legs, no evidence of systemic lymphoma was observed during the follow-up. All cases in the group of SCFL received standard systemic chemotherapy alone or in combination with surgery or radiotherapy. Among them, 12 patients (55%) achieved a complete remission, 3 (14%) had partial remission, 4 (18%) achieved stable disease, and three developed disease progression.

At the end of follow-up, 22 (40%) of PCFCLs showed skin relapses, and 5 (9%) developed extracutaneous disease after a median of 66 months from the initial diagnosis. Fifty-five (93%) patients were alive, 44 of them free of disease, and 11 with remaining disease. One patient died of lymphoma progression, and another three died because of unrelated causes. Cases with multifocal lesions or involving the legs did not display a poorer prognosis. Among the group of SCFL, 13 patients (59%) were alive at the end of follow-up, seven of them free of disease, and six with residual disease. Seven patients died of lymphoma, and another two died of unrelated causes.

3.2 | Histopathological, immunophenotypical, and genetic studies

The results are summarized in Table 2 and Figures 2–4. Most cases in both groups showed a nodular pattern of infiltration mainly affecting the reticular dermis and often extending to the hypodermis. From the cytoarchitectural point of view, both PCFCL and SCFL were mostly composed of large and medium-sized lymphocytes (63% and 55%, respectively), being the involvement by small centrocytes less frequent in both groups. Reactive T-cells were observed in all cases in a variable proportion, but no differences were observed between both PCFCL and SCFL cases. No epidermotropism was present, and the papillary dermis was normally preserved (grenz zone). Neoplastic cells showed a B-cell immunophenotype (CD20+, CD79a+, CD3–CD43–). In all cases, neoplastic follicles were outlined by the presence of a network pattern of follicular dendritic cells. Consistent with a follicle center-origin, BCL6 nuclear expression was positive in virtually all cases studied. CD10 expression was also observed in most patients from both groups (66% and 91% of PCFCLs and SCFLs respectively ($P = 0.032$). Differences in CD10 intensity were also significant, as strong expression was observed in 16% of PCFCL and in 62% of secondary cases ($P = 0.01$). Significant BCL2 expression by neoplastic cell was observed in 69% of PCFCLs and in 100% of secondary cases ($P = 0.003$). According to BCL2 intensity, strong expression was virtually restricted to secondary lymphomas (46%) with only two cases among the PCFCL group (4%) ($P = 0.001$). Among cases studied by FISH analysis ($n = 58$), the translocation t(14;18) was shown in 4/44 (9.1%) PCFCL cases and in 9/14 (64%) SCFLs ($P = 0.001$).

TABLE 2 Histopathological and immunophenotypical features of PCFCL vs SCFL

Histopathological parameters	PCFCL, N = 59	SCFL, N = 22
Pattern of infiltration		
Nodular	35 (59)	10 (46)
Diffuse	12 (20)	7 (30)
Mixed	12 (20)	5 (22)
Predominant cell type		
Large	37 (63)	12 (55)
Small	7 (12)	5 (23)
Mixed	15 (25)	5 (23)
Depth of infiltration		
Superficial dermis	2 (3)	0 (0)
Reticular dermis	37 (63)	16 (73)
Hypodermis	19 (32)	6 (27)
Muscle	1 (2)	0 (0)
BCL-6 expression (PCFCL $n = 57$, SCFL $n = 21$)		
Negative	1 (2)	0 (0)
Positive	56 (99)	21 (100)
BCL-2 expression (PCFCL $n = 54$)		
Negative	17 (32)	0 (0)
Positive	37 (69)	22 (100) ^a
BCL-2 expression intensity (PCFCL $n = 54$)		
Negative	17 (32)	0 (0)
Weakly positive	35 (65)	12 (55)
Strongly positive	2 (4)	10 (46) ^a
CD10 expression (PCFCL $n = 56$, SCFL $n = 21$)		
Negative	19 (33)	2 (10)
Positive	37 (66)	19 (91) ^a
CD10 expression intensity (PCFCL $n = 56$, SCFL $n = 21$)		
Negative	19 (34)	2 (10)
Weakly positive	28 (50)	6 (29)
Strongly positive	9 (16)	13 (62) ^a
t(14;18) (PCFCL $n = 44$, SCFL $n = 14$)		
No translocation	40 (91)	5 (36)
Translocation	4 (9)	9 (64) ^a

Abbreviations: PCFCL, primary cutaneous follicular center-cell lymphoma; SCFL, secondary cutaneous follicular lymphoma; t(14;18): translocation (14;18).

Values are presented as number and (%) unless otherwise indicated.

^a Statistically significant (P value < 0.005).

4 | DISCUSSION

In this study, we have evaluated the clinicopathological features of a large series of PCFCLs and SCFLs. PCFCL is one of the most frequent types of cutaneous B-cell lymphoma. This entity usually has indolent clinical behavior, characterized by frequent cutaneous relapses but little incidence of systemic spread.^{1,2,4} According to the WHO/European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) recommendations, treatment should be based in skin-directed therapies, with local radiotherapy and surgery being the most common initial treatments used.¹³ In contrast, patients with

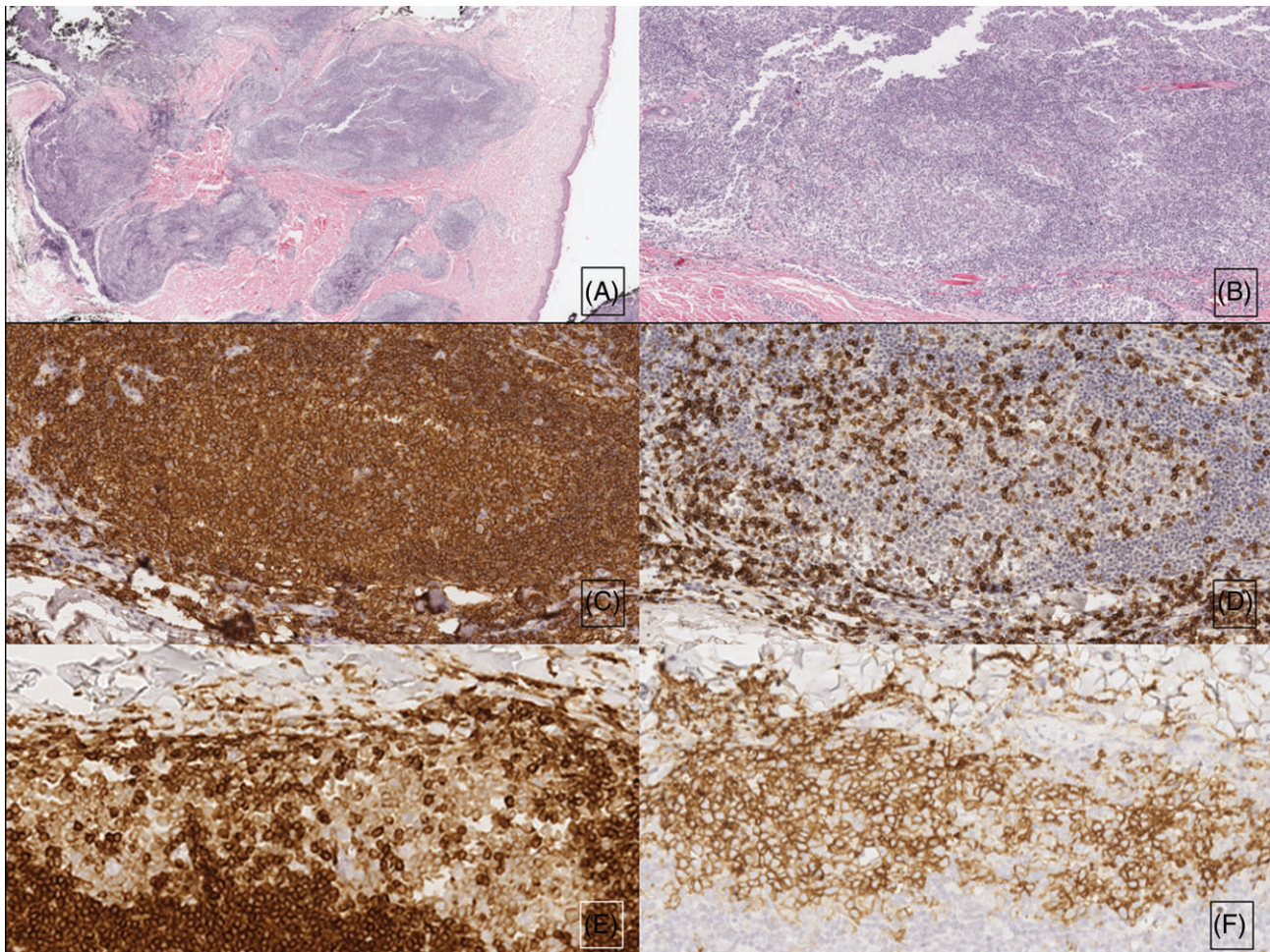


FIGURE 2 Primary cutaneous follicular center-cell lymphoma (PCFCL) showing a nodular pattern of growth. A and B, neoplastic cells are grouped in nodules (haematoxylin and eosin (H&E) 20 \times and 40 \times); C, diffuse CD20 expression in the follicles (100 \times) and D, scattered CD3 positive cells (100 \times); E, BCL2 staining showing weakly positive cells (200 \times) along with F, strong CD10 expression (200 \times)

SCFLs have a worse prognosis and are candidates for systemic polychemotherapy.

Cutaneous lesions may be a possible clinical presentation in patients with systemic follicular lymphomas, and in this particular situation, skin findings can be very similar to those of PCFCL both clinically and histologically.³ A definite diagnosis could only be established after complete clinical examination, careful evaluation of the immunohistochemical features and after performing a systematized staging procedure. Although in most patients with skin involvement by systemic lymphoma, the extracutaneous disease is evident, in some cases early nodal involvement can be very limited and subtle being difficult to elucidate under the standard staging procedures.

In our series, PCFCL patients were a little younger than in SFCLs but no significant clinical differences were observed between the two groups regarding the clinical presentation, type and distribution of skin lesions. As previously described both primary and secondary cases were characterized by nodulotumoural skin lesions mainly affecting the face and neck and scalp areas. However, among PCFCLs, trunk involvement was found to be more frequently seen than

previously reported.^{1,2,5,6} In this series, neither the presence of multifocal lesions (T3) nor leg involvement was associated with a worse outcome. A possible explanation and also a limitation of the study is that because PCFCLs are indolent diseases a longer follow-up may be needed in order to identify such differences.

Despite the favorable response to initial treatment, PCFCLs showed a high incidence of cutaneous relapses (40%). Extracutaneous spread during the follow-up was showed in five cases (9%) an incidence that seems to be slightly higher than that expected for these lymphomas.^{1,4,13} However, these particular patients did not show any specific difference in terms of clinical presentation or immunophenotypic profile. In contrast to SCFL patients, most PCFCLs were alive and free of disease at the end of the study.

On histological grounds, both PCFCL and SCFL were very similar under hematoxylin-eosin examination. In both groups the lymphocytic infiltrate tended to be arranged in a nodular pattern with the diffuse distribution being the second more frequent. Pattern of growth cytologically, both entities showed a mixed centrocytic-centroblastic infiltrates with a predominance of large centrocytes. No differences regarding BCL6 expression between primary and secondary cases

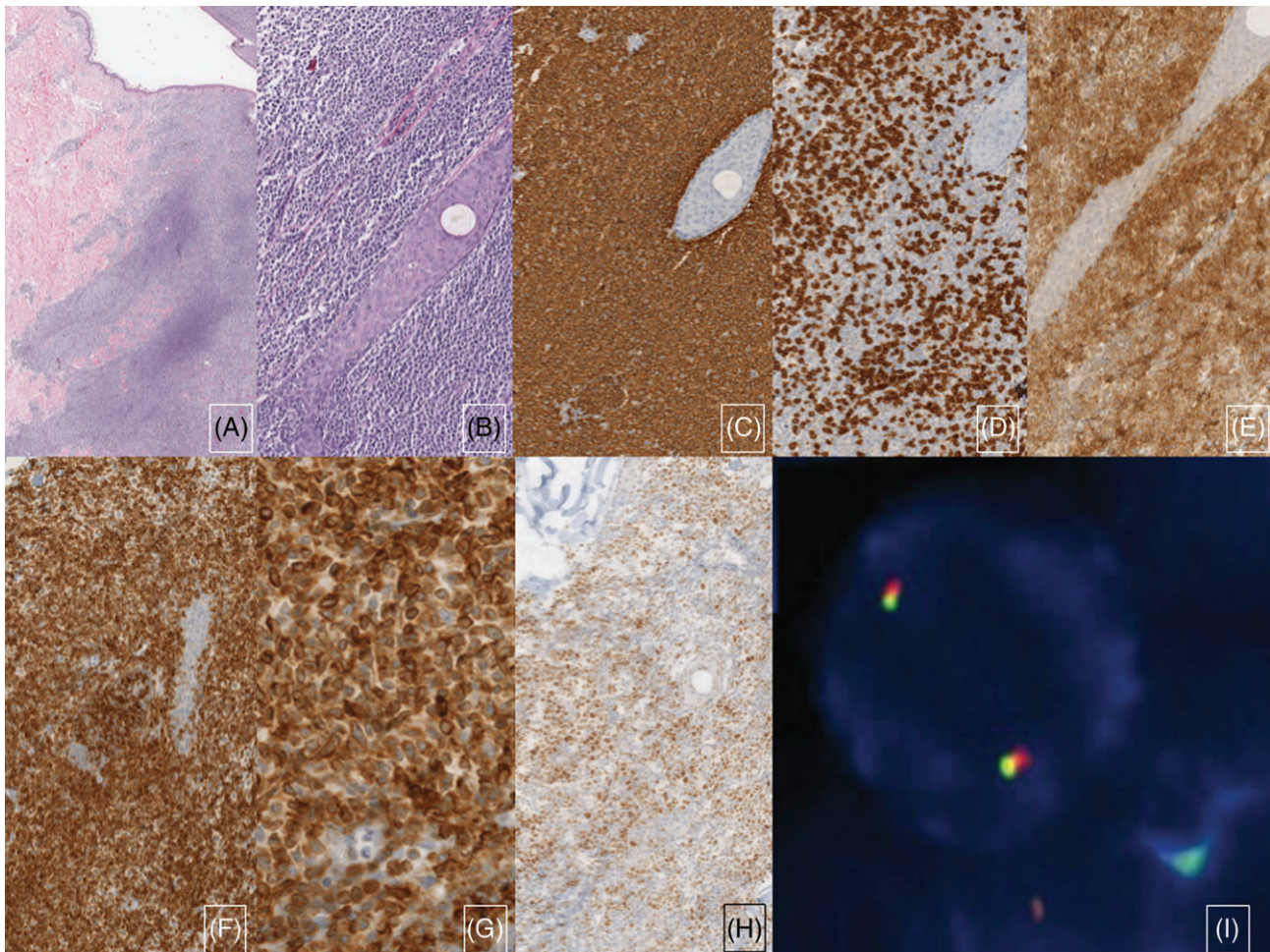


FIGURE 3 Primary cutaneous follicular center-cell lymphoma (PCFCL) with nodular and diffuse pattern of growth. A and B, H&E (20 \times and 100 \times); C, diffuse CD20 expression (100 \times); D, CD3 positive cells (100 \times); E, CD10 positive cells (100 \times) and F and G, strong BCL2 expression by neoplastic centrocytes (100 \times and 400 \times); H, BCL6-positive cells (100 \times); I, FISH analysis for BCL2 showing no rearrangement

were detected. Conversely, remarkable discrepancies regarding immunohistochemical expression of BCL2 and CD10 antigens were observed. In spite of original descriptions establishing that in opposition to systemic follicular lymphomas, PCFCLs were negative or rarely positive for BCL2,¹ several studies on BCL2 status in PCFCLs have given conflicting results, reporting BCL2 protein expression and/or BCL2 gene break in a significant number of cases.^{3,6–10} These discrepancies can be based in different interpretations of antigen expression in the lymphoma cells. In our hands 69% and 66% of PCFCL cases consistently expressed BCL2 and CD10, respectively. However, when we evaluated BCL2 expression intensity, clear-cut significant differences between both groups were noted because strong expression was virtually restricted to SCFLs. Regarding CD10 expression, the intensity of CD10 was not found to be as useful as BCL2 to differentiate both entities because surprisingly a significant number of PCFCL cases (16%) expressed CD10 as strong as the SCFL cases. We believe that differences in BCL2 and CD10 expression between our results and older previous studies could reflect the improvement of antigen retrieval laboratory techniques.

Previous studies have proposed that, the t(14;18) translocation is uniformly negative in PCFCL.⁶ However, recent studies

have identified *IGH/BCL2* fusions with an incidence ranging from 1% to 40%.^{14–16} Such differences have been attributed either to variations in the technical methods used, such as polymerase chain reaction (PCR)-based methods and FISH, or in the diagnostic selection criteria or staging procedures. In the present study, we were able to perform FISH analysis of the t(14;18) in a group of 58 cases (44 PCFCL and 14 SCFL). In accordance with previous reports, we identified a high prevalence of BCL2 rearrangements (68%) in SCFLs. Interestingly, we also identified the t(14;18) translocation in four out of 44 (9%) of PCFCL cases. The prognostic significance of BCL2 rearrangement in PCFCL remains controversial, and some authors suggested worse prognosis and a higher risk of extracutaneous spread for such cases.^{17,18} However, in our series, none of these four cases developed systemic involvement during the follow-up. It is important to emphasize that, in our hands, t(14;18) translocation with BCL-2 expression in PCFCLs does not portend a worse prognosis.

In conclusion, our results confirm that BCL2 and CD10 are significantly expressed in a majority of PCFCL cases and that BCL2 expression intensity is the single most valuable clue in differentiating PCFCL from SCFL cases on histopathological grounds.

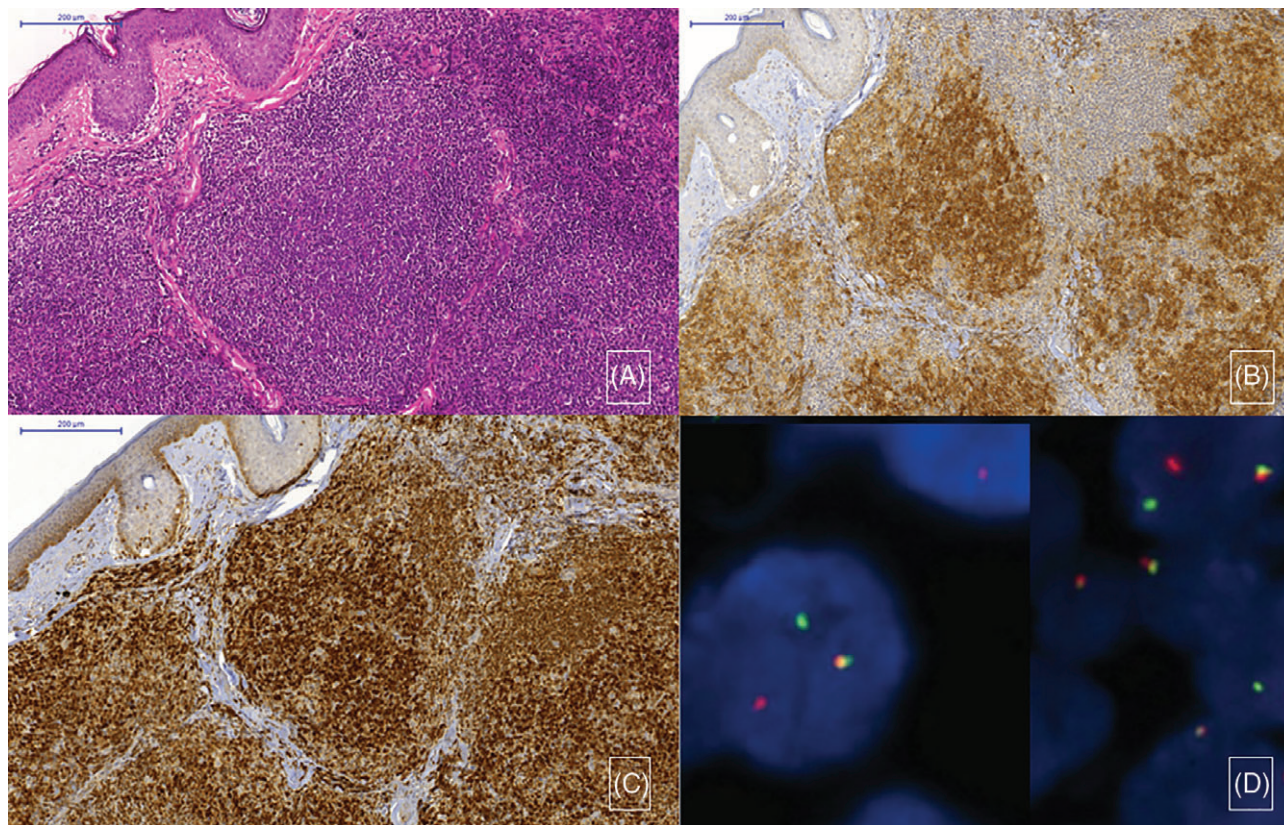


FIGURE 4 Secondary cutaneous follicular lymphoma (SCFL) showing a nodular pattern with CD10 and BCL2 expression. A, this case showed a nodular growth pattern (H&E 100x); B, CD10 was intensively expressed in the neoplastic follicles (CD10 100x); C, strong BCL2 expression by neoplastic centrocytes into the nodules (BCL2 100x); D, FISH analysis for BCL2 showing t(14;18) rearrangement

ORCID

Octavio Servitje  <https://orcid.org/0000-0002-9910-9617>

REFERENCES

- Willenze R, Jaffe ES, Burg G, et al. WHO-EORTC classification for cutaneous lymphomas. *Blood*. 2005;105(10):3768-3785.
- Suárez AL, Querfeld C, Horwitz S, Pulitzer M, Moskowitz A, Myskowsky PL. Primary cutaneous B-cell lymphomas: part I. Clinical features, diagnosis, and classification. *J Am Acad Dermatol*. 2013; 69(3):329.
- Kim B, Surti U, Pandya A, Cohen J, Rabkin MS, Swertlow SH. Clinicopathologic, immunophenotypic, and molecular cytogenetic fluorescence in situ hybridization analysis of primary and secondary cutaneous follicular lymphomas. *Am J Surg Pathol*. 2005;29(1):69-82.
- Grange F, Bekken MW, Wechsler J, et al. Prognostic factors in primary cutaneous large B-cell lymphomas: a European multicenter study. *J Clin Oncol*. 2001;19(16):3602-3610.
- 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(3): 647-655.
- Cerroni L, Arzberger E, Pütz B, et al. Primary cutaneous follicle center cell lymphoma with follicular growth pattern. *Blood*. 2000;95(12): 3922-3928.
- Hoefnagel JJ, Vermeer MH, Jansen PM, Fleuren GJ, Meijer CJ, Willenze R. 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(6):1183-1191.
- Szablewski V, Ingen-Housz-Oro S, Baia M, Delfau-Larue MH, Copie-Bergman C, Ortonne N. Primary cutaneous follicle center lymphomas expressing BCL2 protein frequently harbor BCL2 gene break and may present 1p36 deletion: a study of 20 cases. *Am J Surg Pathol*. 2016; 40(1):127-136.
- Lawnicki LC, Weisenburger DD, Aoun P, Chan WC, Wickert RS, Greiner TC. The t(14;18) and bcl-2 expression are present in a subset of primary cutaneous follicular lymphoma: association with lower grade. *Am J Clin Pathol*. 2002;118(5):765-772.
- Streubel B, Scheucher B, Valencak J, et al. Molecular cytogenetic evidence of t(14;18)(IGH;BCL2) in a substantial proportion of primary cutaneous follicle center lymphomas. *Am J Surg Pathol*. 2006;30(4): 529-536.
- Ventura RA, Martin-Subero JI, Jones M, et al. FISH analysis for the detection of lymphoma-associated chromosomal abnormalities in routine paraffin-embedded tissue. *J Mol Diagn*. 2006;8(3): 141-151.
- de Jong D, Rosenwald A, Chhanabhai M, et al. Immunohistochemical prognostic markers in diffuse large B-cell lymphoma: validation of tissue microarray as a prerequisite for broad clinical applications—a study from the Lunenburg lymphoma biomarker consortium. *J Clin Oncol*. 2007;25(7):805-812.
- Sennf NJ, Noordijk EM, Kim YH, 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(5): 1600-1609.
- Volkenandt M, Cerroni L, Rieger E, et al. Analysis of the 14;18 translocation in cutaneous lymphomas using the polymerase chain reaction. *J Cutan Pathol*. 1992;19(5):353-356.
- Yang B, Tubbs RR, Finn W, Carlson A, Pettay J, Hsi ED. Clinicopathologic reassessment of primary cutaneous B-cell lymphomas with immunophenotypic and molecular genetic characterization. *Am J Surg Pathol*. 2000;24(5):694-702.
- Lucioni M, Berti E, Arcaini L, et al. Primary cutaneous B-cell lymphoma other than marginal zone: clinicopathologic analysis of 161 cases:

- comparison with current classification and definition of prognostic markers. *Cancer Med.* 2016;5(10):2740-2755.
17. Abdul-Wahab A, Tang SY, Robson A, et al. Chromosomal anomalies in primary cutaneous follicle center cell lymphoma do not portend a poor prognosis. *J Am Acad Dermatol.* 2014;70(6):1010-1020.
 18. Pham-Ledard A, Cowppli-Bony A, Doussau A, et al. Diagnostic and prognostic value of BCL2 rearrangement in 53 patients with follicular lymphoma presenting as primary skin lesions. *Am J Clin Pathol.* 2015; 143(3):362-373.

How to cite this article: Servitje O, Climent F, Colomo L, et al. Primary cutaneous vs secondary cutaneous follicular lymphomas: A comparative study focused on BCL2, CD10, and t(14;18) expression. *J Cutan Pathol.* 2019;46:182-189. <https://doi.org/10.1111/cup.13399>

Small-cell predominant extranodal NK/T cell lymphoma, nasal type: clinicopathological analysis of a series of cases diagnosed in a Western population

Penelope A McKelvie,^{1,2} Fina Climent,³ Gregor Krings,⁴ Robert P Hasserjian,¹ Jeremy S Abramson,⁵ Ben Z Pilch,¹ Nancy Lee Harris,¹ Judith A Ferry,¹ Lawrence R Zukerberg¹ & Aliyah R Sohani¹

¹The James Homer Wright Pathology Laboratories of the Massachusetts General Hospital and Department of Pathology, Harvard Medical School, Boston, MA, USA, ²Department of Anatomical Pathology, St Vincent's Hospital, Melbourne, Australia, ³Department of Pathology, University Hospital of Bellvitge-IDIBELL, Barcelona, Spain, ⁴Department of Pathology, University of California San Francisco School of Medicine, San Francisco, CA, USA, and ⁵Center for Lymphoma, Massachusetts General Hospital Cancer Center and Department of Medicine, Harvard Medical School, Boston, MA, USA

Date of submission 27 January 2016
Accepted for publication 1 May 2016
Published online Article Accepted 4 May 2016

McKelvie P A, Climent F, Krings G, Hasserjian R P, Abramson J S, Pilch B Z, Harris N L, Ferry J A, Zukerberg L R & Sohani A R

(2016) *Histopathology* 69, 667–679. DOI: 10.1111/his.12990

Small-cell predominant extranodal NK/T cell lymphoma, nasal type: clinicopathological analysis of a series of cases diagnosed in a Western population

Aims: Extranodal NK/T cell lymphoma, nasal type (ENKTCL) is usually composed of medium- to large-sized lymphoid cells showing prominent angiotrophism and tumour cell necrosis. We report 13 cases composed predominantly of small lymphocytes diagnosed in the United States and Western Europe.

Methods and results: Patients included seven females and six males aged 17–75 years. Ten presented with sinonasal and three with buccal disease. Nine had stage IE/IIIE and four had stage IV disease. In five of seven patients with multiple biopsies at different time-intervals, the lymphoma was misinterpreted as representing chronic inflammation on an earlier biopsy. In all cases morphology showed a dense infiltrate of small lymphoid cells with minimal cytological atypia. Necrosis, angioinvasion and angiodestruction were each

seen in 17%, 22% and 17% of biopsies. Median Ki67 was 5%. Four patients died of lymphoma 4–16 months after diagnosis, including three of four patients with stage IV disease; seven (54%) are alive with no evidence of disease at a median of 39 months; one patient with stage IV disease is alive at 10 months and one recurred at 17 months.

Conclusions: In sinonasal biopsies with predominantly small lymphocytic infiltrates with admixed chronic inflammation, focal hypercellularity, focal surface ulceration or microscopic bone invasion by small lymphoid cells should alert pathologists to the possibility of small-cell predominant ENKTCL. Awareness of the full histological spectrum of ENKTCL, particularly in non-endemic areas, is important in avoiding a delay in diagnosis and ensuring timely initiation of therapy.

Keywords: chronic active EBV infection, chronic rhinosinusitis, EBER *in-situ* hybridization, Epstein–Barr virus, extranodal NK/T cell lymphoma, nasal type

Introduction

Extranodal NK/T cell lymphoma, nasal type (ENKTCL) is an aggressive, predominantly extranodal lymphoma associated with Epstein–Barr virus (EBV) that presents most commonly in the upper aerodigestive tract, particularly the nasal cavity. The classic histological features include a proliferation of pleomorphic medium- to large-sized cells with prominent angioinvasion and angiodestruction, and large areas of tumour cell necrosis. Cases composed mostly of small cells have been described, mainly in endemic areas with higher prevalence such as East Asia, Mexico and Central and South America.^{1–5} Diagnosis of such cases in non-endemic regions may be challenging due to the lower prevalence and subtle histology.^{6,7} We have encountered sinonasal cases in which the diagnosis of ENKTCL was delayed for more than a year due to the bland, uniform cytology, absence of characteristic angioinvasion and angiodestruction, minimal necrosis and prominent admixture of inflammatory cells, mimicking a reactive process. We describe the clinicopathological features of 13 cases of small-cell predominant ENKTCL occurring in patients in the United States and Western Europe, with the goal of identifying characteristics to aid in the timely recognition of such cases in non-endemic regions.

Materials and methods

The study was approved by the Partners HealthCare Institutional Review Board prior to its initiation (protocol # 2007P001458, last approval date 25 January 2016). A total of 13 cases of small-cell predominant ENKTCL were identified from various sources, as detailed in the online Supporting information, eight of which were presented previously at national or international meetings and one was published previously.^{6,8,9} The diagnosis of ENKTCL was made in all cases according to criteria specified in the 2008 World Health Organization (WHO) classification.⁵ Small-cell predominance was defined as ENKTCL in which more than 90% of the neoplastic cells had nuclei that were the same size or slightly larger than those of small lymphocytes, but clearly smaller than histiocytic nuclei. Cases with predominantly medium or large nuclear size (similar to or exceeding the size of histiocytic nuclei) were excluded. Based on these criteria, cases with small-cell predominance represented 12% of all ENKTCL diagnosed at a single institution in the United States during a 10-year interval.

All cases were positive for EBV-encoded small RNA (EBER) by *in-situ* hybridization and exhibited either a typical NK cell immunophenotype (CD2⁺, surface CD3⁻, CD56⁺) or were CD56⁻ but positive for cytotoxic granule proteins. Haematoxylin and eosin (H&E) and immunohistochemical-stained slides were examined in all cases, and subsets of cases were analysed by additional immunohistochemistry, flow cytometry and/or molecular genetic analysis using methods described previously and as outlined in further detail in the online Supporting information.^{10–13}

Clinical follow-up was obtained from medical records or by contacting outside pathologists or other physicians involved in the patient's care. Differences in continuous and categorical variables between groups were compared using the Mann–Whitney and Fisher's exact tests, respectively. Overall survival (OS) was defined as the time from diagnosis to death from any cause, and was analysed using the Kaplan–Meier method with the log-rank test used to compare differences in survival between various disease subgroups. Patients who were alive or lost to follow-up were censored at the time last seen alive. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism software version 5 (La Jolla, CA, USA).

Results

CLINICAL FEATURES

Clinical features are summarized in Table 1. The 13 patients included six males and seven females [male:female (M:F) ratio 0.85] with a median age at diagnosis of 48 years (range = 17–75). Patients were of diverse ethnic backgrounds, including six Caucasians (46%), five Hispanics (38%) and one each of Native American (7.5%) and South-East Asian (7.5%) origin. Caucasians were significantly older than non-Caucasians (median ages 68.5 versus 30 years, $P = 0.002$).

Ten patients (77%) had involvement of nasal cavity or paranasal sinuses, with bilateral involvement in eight, and three patients (23%) had disease in the buccal cavity or mouth. Patient 4, who presented initially with buccal disease, developed contemporaneous disease in the endomyocardium and pericardium and subsequently had sinonasal involvement 8 months later. This patient had a history of acute EBV infection involving a cervical lymph node 1 year prior to diagnosis and chronic dacryoadenitis with lymphocytic infiltration of the lacrimal gland 7 months before diagnosis, for which she was treated with intermittent high-dose prednisone during the course of a year. These clinical findings, in

Table 1. Clinical features of small-cell predominant extranodal NK/T cell lymphoma, nasal type

Case	Age (years)	Sex	Race/ethnicity	Site(s) of disease*	Presenting symptoms	Radiology	Stage	Treatment	Follow-up**
1	30	F	Hispanic	A. Nasal cavity B. Nasal cavity and sinus contents, 2 months C. Nasal cavity and sinus contents, 12 months*	Nasal congestion and chronic sinusitis with granular, friable, bloody turbinate and deviated nasal septum	Polypoid soft tissue in nasal cavity, intact but slightly deviated septum, opacification and mucosal thickening of sphenoid and maxillary sinuses	IE	Localized XRT (60 Gy)	NED at 38 months
2	23	M	Native American	A. Right buccal mucosa B. Right buccal mucosa, time interval not known*	Facial swelling, with gradual increase in size over 2 years	NK	IE/IIIE	Localized XRT (initial), salvage with ICE, brain XRT	Local recurrence, 11 months. CNS relapse, 13 months. DOD, 14 months
3	48	M	Caucasian	Left nasal mass*	Left nasal congestion, obstruction, and mass	5 cm soft tissue mass in left nasal cavity with deviation of bone but no bone invasion	IE/IIIE	Combined XRT (50.4 Gy) and chemotherapy (3 cycles DeVIC)	NED at 7 months
4	17	F	Hispanic	A. Endomyocardium B. Buccal mucosa, 3 days* C. Pericardium, 1 week D. Nasopharynx and right ostemeatal complex, 8 months	Acute EBV infection with cervical adenopathy 2 years prior. Swelling and sores on buccal mucosa, with lower lip numbness. Pericardial effusion	Positive gallium scan in lacrimal, submandibular and parotid glands following acute EBV infection	IV	XRT, multiple cycles CHOP	Progressive disease involving mediastinum, liver, parotid gland, pericardium and chest wall. DOD at 10 months
5	46	M	Hispanic	A. Ethmoid sinuses, bilateral turbinates* B. Right nasal cavity and ethmoid sinus, 4 months	Chronic sinusitis, nasal congestion	NK	IE	XRT, unspecified chemotherapy	NED at 70 months
6	29	M	Hispanic	A. Bilateral paranasal sinuses* B. Bilateral paranasal sinuses, 17 months	Chronic sinusitis, nasal obstruction with deviated nasal septum	Mucosal thickening in ethmoid, frontal, maxillary, and sphenoid sinuses bilaterally. Deviated nasal septum. Opacified ostiomeatal unit complexes	IE	XRT	Recurrent disease, 17 months

Table 1. (Continued)

Case	Age (years)	Race/ Sex ethnicity	Site(s) of disease*	Presenting symptoms	Radiology	Stage	Treatment	Follow-up**
7	51	F Hispanic	Right nose and turbinate*	Incidental finding at surgery for deviated septum and chronic sinusitis	NK	IE	Combined XRT and chemotherapy (3 cycles DeVIC)	NED at 49 months
8	32	F South East Asian	Bilateral maxillary ethmoid sinus*	Chronic rhinitis, hypertrophied turbinates	Changes consistent with chronic sinusitis	IE	Combined XRT and unspecified chemotherapy, autoSCT	NED at 39 months
9	66	M Caucasian	A. Bilateral ethmoid and sphenoid sinuses B. Bilateral ethmoid and sphenoid sinuses, 14 months*	Chronic rhinosinusitis, nasal obstruction, recurrent sinus infections	A. Opacified right maxillary antrum, mucosal thickening in ethmoid, consistent with chronic sinusitis. B: 4 cm soft tissue FDG-avid mass in left nasal cavity	IE	Bilateral total ethmoid, sphenoid maxillary and frontal sinusotomies. XRT (60 Gy) followed by 3 cycles CHOEP	NED at 61 months
10	73	F Caucasian	Right cheek muscle and mouth*	Spontaneous lesion within oral cavity extending to cheek muscle, associated with numbness and gross purulence.	Cheek mass with central necrosis, suggestive of abscess.	IV	Supportive care	DOD at 4 months
11	75	F Caucasian	Bilateral nose and sinus contents*	Recurrent chronic sinusitis	NK	IE	XRT.	NED at 12 months
12	71	M Caucasian	Bilateral sinus contents*	Nasal blockage, periorbital edema, extending to cheeks after surgery	CT: advanced pansinusitis. MRI: bilateral paranasal sinus, maxillofacial, orbital, prenasal and glabellar superficial soft tissue disease.	IV	XRT + 2 cycles attenuated SMILE, HD IT MTX, leucovorin rescue and PEG-asparaginase	Alive with persistent disease at 10 months

Table 1. (Continued)

Case	Age (years)	Sex	Race/ethnicity	Site(s) of disease*	Presenting symptoms	Radiology	Stage	Treatment	Follow-up**
13	63	F	Caucasian	A. Ethmoidal sinus B. Forearm skin, 34 months* C. Nasal polyp, 35 months D. Skin, 46 months E. Peripheral blood, 49 months	Chronic sinusitis at time of ethmoidal biopsy. Development of skin lesion and nasal polyp subsequently.	Changes consistent with chronic sinusitis	IV	CHOP × 6. Salvage regimens included SMILE and ESHAP	Cutaneous, nodal and CNS recurrence at 12 months. Leukemic dissemination at 15 months. DOD at 16 months

M, male; F, female; NK, not known; CT, computed tomography; FDG, fluorodeoxyglucose; XRT, radiotherapy; ICE, ifosfamide, carboplatin, etoposide; CHOP, cyclophosphamide, adriamycin, vincristine, prednisolone; CHOEP, cyclophosphamide, adriamycin, vincristine, etoposide, prednisolone; DeVIC, dexmethasone, etoposide, vincristine, ifosfamide, carboplatin; SMILE, steroid (dexmethasone), methotrexate, ifosfamide, L-asparaginase and etoposide; ESHAP, etoposide, cytarabine, disiplatinum and methylprednisolone; HD IT MTX, high-dose intrathecal methotrexate; autoSCT, autologous stem cell transplant; NED, no evidence of disease; DOD, died of disease; Gy, Gray.

*Patients with multiple specimens have these listed in chronological order, followed by time from first biopsy. Asterisk indicates the biopsy in which the diagnosis of ENKTCL was initially made.

**All follow-up intervals are from time of biopsy in which the diagnosis of ENKTCL was initially made (indicated by single asterisk in patients with multiple specimens).

conjunction with markedly elevated antibody titres to EBV-associated antigens, were consistent with chronic active EBV (CAEBV) infection.^{14–18}

Patients with sinonasal disease presented with symptoms of chronic rhinosinusitis and nasal obstruction and congestion, with or without deviated nasal septum. In one patient, the tumour was diagnosed from a biopsy of tissue taken during surgery for septal repair. Only two of 10 patients with sinonasal disease presented with a clinically evident mass or polyp, although additional abnormalities were detectable by imaging (see below). The three patients with buccal involvement presented with visible mucosal lesions, with associated numbness in two and a 2-year history of gradual facial swelling in one.

Information from computed tomography (CT) imaging studies was available in seven patients. Five patients with sinonasal disease had variable mucosal thickening in the nasal cavity and sinuses consistent with chronic rhinosinusitis, and in four patients imaging identified a polypoid soft tissue mass in the nasal cavity, measuring up to 5 cm in maximum dimension. No bone invasion was detected by CT scan in any of the cases.

Nine patients (69%) had localized disease (stages IE or IIE) confined to the upper aerodigestive tract. Four had stage IV disease, one each with involvement of bone marrow, heart, skin, and parotid gland and associated cheek soft tissue. Bone marrow examination was performed in three patients, two for staging (both negative) and one for investigation of pancytopenia, which revealed subtle marrow involvement by ENKTCL with associated haemophagocytic lymphohistiocytosis.

MORPHOLOGY

A total of 23 biopsies from the 13 cases were examined, with seven patients (five with sinonasal and two with extranasal disease) having multiple biopsies at different time-intervals. All cases, including the initial biopsies in patients with multiple biopsies, showed dense infiltrates of uniformly small or slightly enlarged lymphocytes with condensed chromatin, round to slightly irregular nuclei and absent nucleoli in a background of non-neoplastic inflammatory cells, including small lymphocytes, plasma cells (often numerous), histiocytes and eosinophils (Figure 1A–C). In some biopsies, the cells had clearing of the cytoplasm and monocytoid features similar to those seen in marginal zone lymphoma (Figure 1D). In two sinonasal cases the infiltrates were multinodular rather than diffuse, with focal areas of

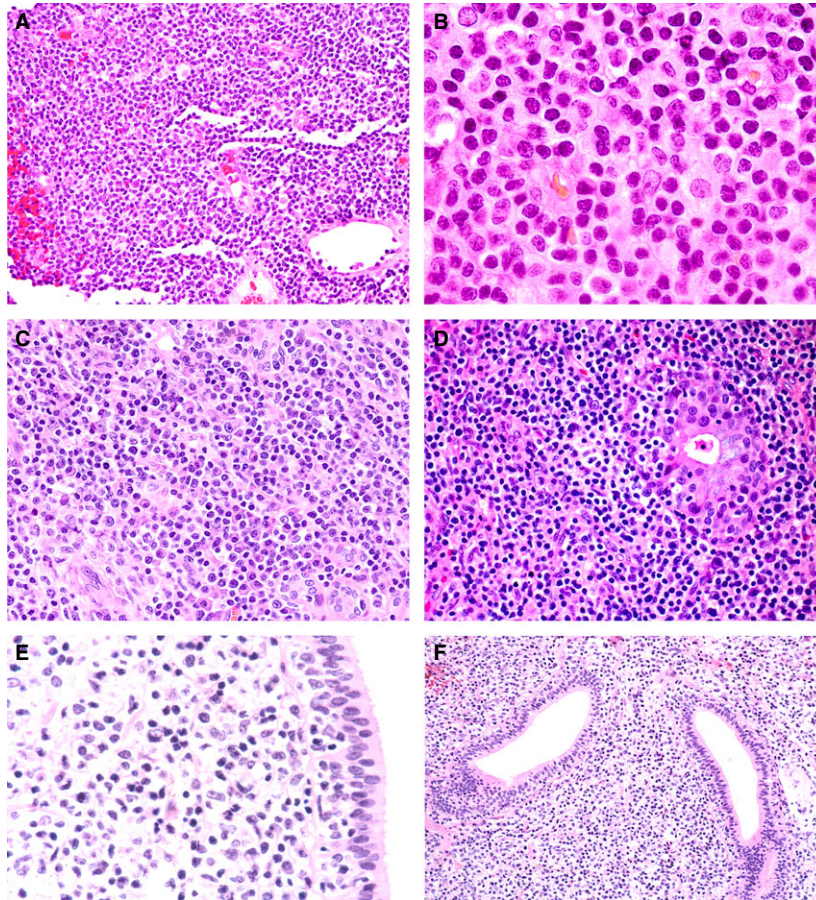


Figure 1. Cytomorphological features of small-cell predominant extranodal NK/T cell lymphoma. Nasal biopsy from patient 3 showing dense, diffuse infiltrates of small, bland-appearing lymphocytes with slight nuclear irregularities [(A) haematoxylin and eosin (H&E)]. Initial nasal cavity biopsy from patient 1, thought to represent benign chronic rhinosinusitis, showing uniform small-cells (B, H&E). In many cases, there was an intimate admixture of chronic inflammatory cells, including histiocytes and plasma cells; the latter were often numerous, as in this case from patient 2 (C, H&E). Nasal biopsy from patient 7 showing small lymphocytes with scant clear cytoplasm forming focal intraepithelial collections within glands mimicking extranodal marginal zone lymphoma (D, H&E). Buccal biopsy from patient 4 showing small lymphocytes with moderate clear cytoplasm and slight nuclear irregularities with focal involvement of overlying epithelium (E, H&E), but overall preservation of mucosal glands (F, H&E)

hypercellularity. Unlike typical cases of ENKTCL, mucosal glands were generally intact, without replacement or destruction by the lymphoma cells (Figure 1E, F); this feature was present in all but one biopsy, which showed only focal lymphocytic infiltration into ducts and acini. In the sinonasal cases a minor degree of surface ulceration and necrosis was seen in four biopsies from two patients, while one case had prominent pseudoepitheliomatous hyperplasia of the surface epithelium (Figure 2A,B). Zonal tumour cell necrosis was seen in four cases (three sinonasal, one buccal), and overall in only four of 23 biopsies (17%) (Figure 2C). Five cases (22% of biopsies) had angioinvasion with infiltration of vessel walls by neoplastic lymphoid cells, but only four showed angiodestruction with vascular injury and associated thrombosis or

fibrinoid necrosis (17% of biopsies) (Figure 2C,D). Four sinonasal cases (five of 16 biopsies, 31%) had focal microscopic bone invasion, one with associated bone destruction (Figure 2E,F). In one of three buccal cases, there was invasion of skeletal muscle. Among the 13 cases, 11 lacked mitotic figures, but small numbers (up to two per 10 high-power fields) were seen in two cases. No reactive lymphoid follicles with germinal centres were seen, but two cases contained small nodules of B cells.

IMMUNOPHENOTYPE AND MOLECULAR DIAGNOSTIC STUDIES

Immunophenotypical features, as assessed by immunohistochemistry and/or flow cytometry, and

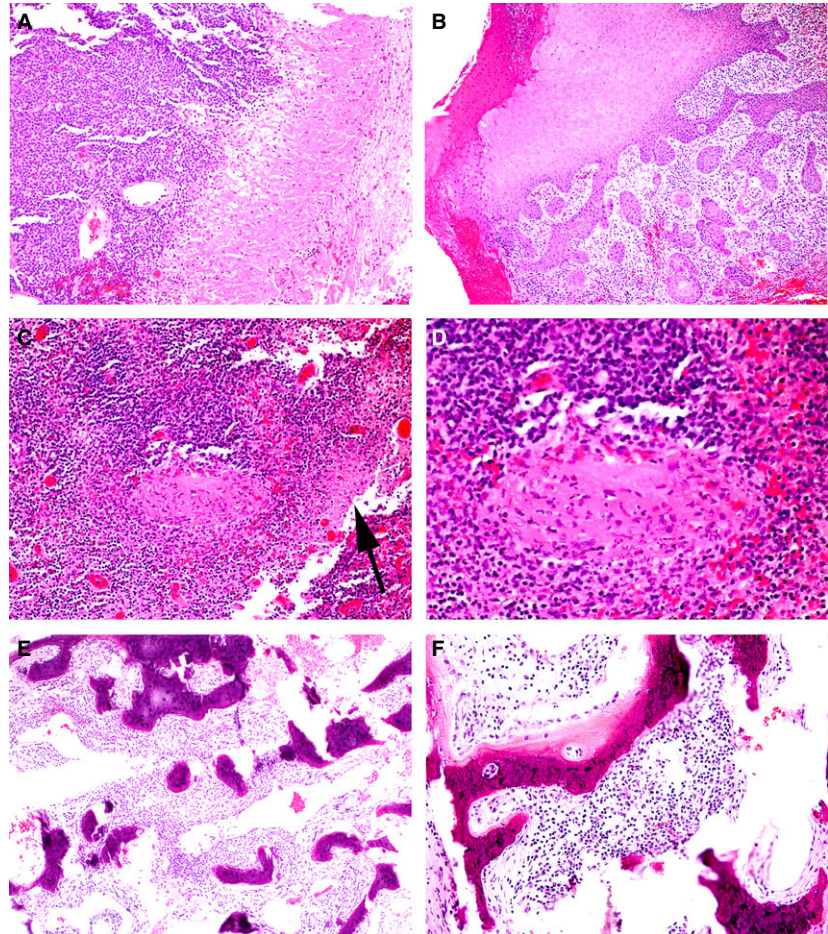


Figure 2. Epithelial, vascular and bone changes seen in cases of small-cell predominant extranodal NK/T cell lymphoma. Examples of cases exhibiting surface ulceration with necrosis [(A) haematoxylin and eosin (H&E)], pseudoepitheliomatous hyperplasia of surface epithelium (B, H&E) and angioinvasion by tumour cells (C, H&E) with associated zonal necrosis of tumour (arrow), both of which were focal. Higher-power view of angioinvasion with adjacent tumour cell necrosis and apoptosis below and viable small lymphoid cells above the affected blood vessel (D, H&E). Microscopic bone invasion, as seen in two different cases (E,F, H&E).

molecular diagnostic studies are summarized in Table 2. All 13 cases showed dense, diffuse or nodular positivity for EBV by EBER *in-situ* hybridization in virtually all tumour cells (Figure 3). Eight cases (62%) were of NK lineage with CD56 positivity in all but one, which showed cytotoxic granule expression of perforin and T cell intracellular antigen-1 (TIA-1). Five cases (38%) showed features consistent with T cell lineage, which was associated significantly with Caucasian ethnicity ($P = 0.005$). CD30 was negative in all eight cases tested. Ki67 stain was performed in 14 biopsies from nine patients, and showed a median proliferation index of 5% (range <5% to 70%); only three biopsies had a proliferation index of $\geq 30\%$.

A monoclonal T cell receptor (*TCR*) gene rearrangement was detected by polymerase chain reaction (PCR) in three patients with T lineage tumours in whom this study was performed. In case 13, biopsies of lymphoma involving the skin, nasal cavity and ethmoidal sinus showed identical clones. *TCR* gene rearrangement studies were performed in one NK lineage case and were negative. In case 4, with CAEBV

infection, clonal EBV and *TCR* β segment deletion were detected by Southern blot in the lymphoma specimens. The prior lymph node and lacrimal gland showed clonal EBV of the same band size as the lymphoma.

EVOLUTION OF PATHOLOGICAL FEATURES IN PATIENTS WITH MULTIPLE BIOPSIES

In five of 13 patients (38%), the diagnosis of ENKTCL was missed on an earlier biopsy and the morphological features were thought initially to represent a reactive process, usually chronic rhinosinusitis. One patient (case 1) had undergone two biopsies of sinonasal mucosa before the diagnosis of ENKTCL was made. In two patients (cases 9 and 13), with time-intervals between biopsies of 14 and 34 months, respectively, there was significant progression from bland cytology and <5% Ki67 proliferation index to more typical features of ENKTCL and a higher Ki67 proliferation index of 50–70% (Figures 3–4). More subtle changes over time were seen in other patients

Table 2. Immunophenotypical and molecular genetic features of small-cell predominant extranodal NK/T cell lymphoma, nasal type*

Case	Biopsy (if multiple)	Lineage	Surface		Cyto		CD2	CD3 ^Δ	CD5	CD7	CD56	CD4	CD8	TCR#	Perforin	Granzyme B	TIA-1	CD30	Ki67 proliferation index	TCR gene rearrangement
			CD2	CD3**	CD3 ^Δ	CD3 ^Δ														
1	A-C	NK	+	-	+w	-	+w	-	-	+w	+	-	-	αβ ⁻ , γδ ⁻	-	+	ND	-	<5% on earlier 2 biopsies; 5-15% on 3rd biopsy	Polyclonal TCRγ
2	A, B	NK	ND	ND	+	-	ND	+	ND	+	-	-	ND	ND	ND	+	+	ND	ND	ND
3	-	NK	+	ND	+w	-	+w	-	-	+w	+	-	-	β F1 ⁻	+	+	ND	-	5-10%	ND
4	A-D	NK	+	-	+w	-	+w	-	-	+	+	-	-	αβ ⁻ , γδ ⁻	+	ND	+	-	<5%	No signal with TCRβ probe
5	-	NK	+	ND	+w	-	+w	-	ND	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	<5%	ND
6	A, B	NK	+	ND	+	ND	ND	ND	-	ND	-	-	-	ND	Scattered +	ND	+	ND	ND	ND
7	-	NK	+	-	+w	-	+w	-	-	+w	+	-	-	αβ ⁻ , γδ ⁻	+	Scattered +	ND	ND	30%	ND
8	-	NK	ND	ND	+	-	+	+	-	+	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
9	A	T	ND	ND	+	+w	-	-	-	-	-	+	+	β F1 ⁺	ND	ND	ND	-	5%	ND
	B		+	+	+	+w	-	-	-	-	-	+	+	αβ ⁺ , γδ ⁻	+	+	ND	ND	50%	ND
10	-	T	ND	ND	+	+	-	-	-	-	-	+	+	ND	-	+	ND	-	5-10%	Monoclonal TCRγ
11	-	T	ND	ND	+	+w	-	-	-	-	-	+	+	ND	-	+	ND	ND	10%	Monoclonal TCRγ
12	-	T	ND	ND	+	+	ND	+	-	ND	+	+w	+	ND	ND	+	ND	ND	ND	ND
13	A	T	ND	ND	+	+	-	-	-	-	-	+	+	ND	ND	ND	ND	-	<5%	Monoclonal TCRβ
	B		+	ND	+	+	-	-	-	+	+	+	+	ND	ND	+	+	-	70%	Monoclonal TCRβ
	C		+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	αβ ⁺ , γδ ⁻	ND	ND	ND	-	15%	Monoclonal TCRβ

+ , positive; +w, weakly positive; -, negative; Cyto, cytoplasmic; ND, not done; TCR, T cell receptor; TIA-1, T cell intracellular antigen-1.

*All cases showed dense nodular or diffuse positivity for Epstein-Barr virus (EBV) by EBER *in-situ* hybridization. EBV latent membrane protein (LMP) was performed by immunohistochemistry in cases 4 and 6, both of which were negative.

**Performed by flow cytometry.

ΔPerformed by immunohistochemistry.

#Staining for αβ and γδ performed by flow cytometry and β F1 by immunohistochemistry.

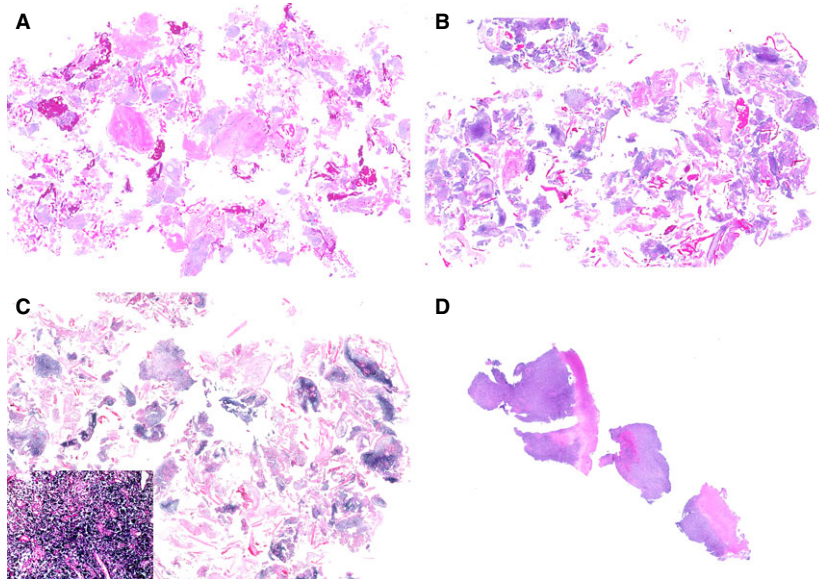


Figure 3. Low-power histological features of small-cell predominant extranodal NK/T cell lymphoma and similarity to benign chronic rhinosinusitis in early lesions. Sinonasal fragments from a patient with benign chronic rhinosinusitis showing some nodular hypercellularity, but less than the density seen in early ENKTCL [(A) haematoxylin and eosin (H&E)]. Initial sinonasal biopsy, called negative, from patient 9 showing multiple areas of dense hypercellularity within the lamina propria but overall preservation of the glandular architecture (B, H&E). Initial sinonasal biopsy from patient 9 showing multiple areas of dense nodular reactivity for Epstein–Barr virus-EBV-encoded small RNA (EBV-EBER) in the lymphoma cells within the lamina propria [(C) and inset, EBER *in-situ* hybridization]. Sinonasal fragments from the second and diagnostic sinonasal biopsy from patient 9 taken 14 months after the first, showing uniform dense hypercellularity of the lamina propria, surface ulceration and loss of the normal glandular architecture (D, H&E).

with multiple biopsies, including the development of slightly more atypical cytology, small foci of necrosis and a mild increase in mitotic activity.

TREATMENT AND CLINICAL OUTCOME

Clinical follow-up was available in all 13 patients (Table 1). Four patients (three sinonasal, one buccal) received localized radiotherapy only; seven patients (six sinonasal, one buccal) received localized radiotherapy with chemotherapy, one of whom subsequently underwent autologous stem cell transplant; one patient with stage IV disease (case 13) received chemotherapy only; and the patient with buccal disease and bone marrow involvement (case 10) received supportive care only. Four patients (31%) died of disease at 4–16 months (median 12 months) after diagnosis, including three of four patients (75%) with stage IV disease. All three patients who presented with buccal disease died, with rapid disease progression in two and development of haemophagocytic lymphohistiocytosis in the other. The fourth patient who died (case 13) was diagnosed initially with ENKTCL on a biopsy of a skin nodule and was found subsequently to have nasal

involvement by lymphoma on retrospective review of a sinonasal biopsy from 3 years previously. Although she achieved remission after initial chemotherapy she relapsed with cutaneous, nodal and central nervous system disease 12 months after diagnosis, then developed leukaemic dissemination while undergoing salvage treatment, and died at 16 months. Seven patients are alive with no evidence of disease at a median follow-up of 39 months (range 7–70 months). One patient is alive with stage IV disease at 10 months and one developed recurrent tumour at 17 months with no further follow-up available.

The median OS of all 13 patients was not reached after a median follow-up time of 38.5 months for living patients (Figure 5A). Patients with primary buccal disease had a significantly shorter OS versus those with sinonasal disease (10 months versus not reached, $P = 0.0003$, Figure 5B), as did patients who presented with stage IV versus localized disease (10 months versus not reached, $P = 0.004$, Figure 5C). Other clinical and pathological features were not associated with OS, including older age (>50 or >60 years), Caucasian versus non-Caucasian ethnic background and NK versus T cell lineage.

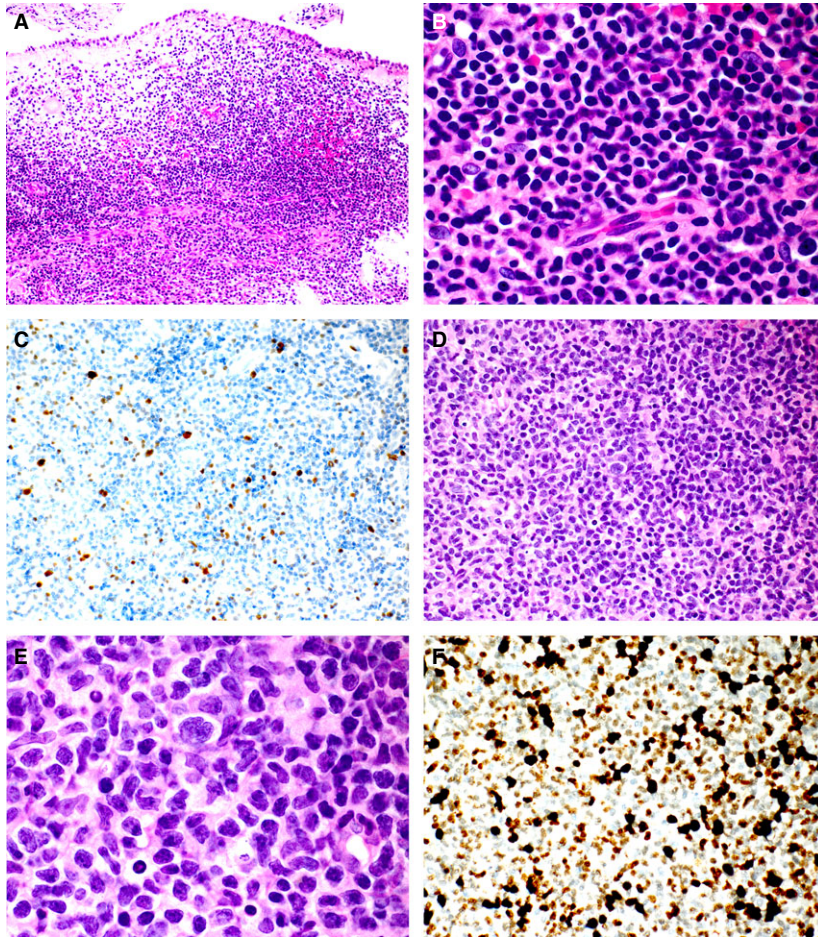


Figure 4. Changes in cytological features and proliferation index over time in a patient with small-cell predominant extranodal NK/T cell lymphoma (ENKTCL). The initial biopsy from patient 9 (same case as illustrated in Figure 3B–C) shows areas of dense hypercellularity within the lamina propria [(A) haematoxylin and eosin (H&E)] consisting of uniformly small lymphocytes with relatively bland cytology (B, H&E) and a low proliferation index of <5% (C, Ki67 immunohistochemistry). The subsequent biopsy from the same patient (the same case as illustrated in Figure 3D) shows more typical features of ENKTCL with a proliferation of pleomorphic medium-sized cells (D, H&E), occasional large cells and rare apoptotic debris (E, H&E) and a higher proliferation index of approximately 50% (F, Ki67 immunohistochemistry).

Discussion

Small-cell predominant ENKTCL is generally well recognized in endemic areas with a high prevalence of this EBV-related lymphoma, but in Western regions the diagnosis may be overlooked in clinical specimens of sinonasal mucosa, particularly when there is no mass or clinical suspicion of malignancy.^{3–7} Our series included a number of sinonasal cases where the diagnosis was delayed for up to 3 years due to the bland, uniform cytology, low proliferation index and associated reactive inflammatory background, including small reactive lymphocytes, histiocytes, eosinophils and often many plasma cells. Another feature leading to difficulty in distinguishing small-cell predominant ENKTCL from the more common diagnosis of chronic rhinosinusitis was only patchy hypercellularity and no loss of acinar architecture, features that contrast with the more typical histology of this entity. Tumour cell necrosis, angioinvasion and angiodestruction were uncommon in our series, occurring in 17–22% of biopsies examined. This is

similar to a Taiwanese series of 22 ENKTCL that included five (23%) small-cell predominant cases, none of which had angiodestruction, thrombosis or necrosis, and only two of which showed angioinvasion.⁴ By contrast, a recent large US series of 73 cases of ENKTCL found angioinvasion and angiodestruction in 69% and necrosis in 92% of cases overall; this series included five cases (7%) with small-cell predominance, but the presence or absence of such features in these cases was not specifically reported.⁷ Clues to the diagnosis of small-cell predominant ENKTCL in sinonasal biopsies include focal hypercellularity, focal surface ulceration or necrosis and microscopic bone invasion by small lymphoid cells. Some cases may also show some cytological atypia, with slight cellular enlargement, slight nuclear irregularity, and more abundant cytoplasm than normal small lymphocytes. Such features, which can be subtle, should alert the pathologist to the possibility of small-cell predominant ENKTCL and prompt screening with EBER *in-situ* hybridization, followed by immunohistochemistry for NK and T cell markers,

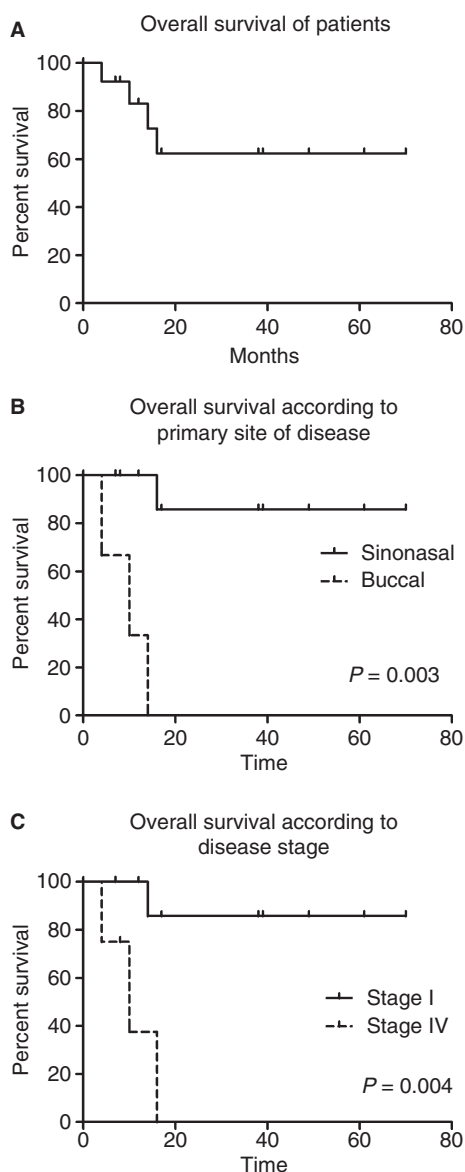


Figure 5. Kaplan–Meier curves showing overall survival (OS) for all 13 patients with small-cell predominant extranodal NK/T cell lymphoma (A, median OS not reached). Patients with primary buccal disease had significantly shorter OS versus those with sinonasal disease (B, median 10 months versus not reached, $P = 0.0003$), as did patients who presented with stage IV versus localized disease (C, median 10 months versus not reached, $P = 0.004$).

including cytotoxic granule proteins, to confirm the diagnosis.

In addition to these morphological differences, cases of small-cell predominant ENKTCL also showed immunophenotypical differences from tumours with more typical histology. Proliferation index by Ki67 was low overall in our series, ranging from <5% to 10% in most initial biopsies, with a single case

showing a moderate proliferation index of 30% on initial biopsy. By contrast, the median Ki67 proliferation index in the recent large US study was 50% overall, with only 15 cases (21%) having a proliferation index <30%.⁷ CD30 was negative in all cases tested in our series. This contrasts with the findings of other authors who have demonstrated CD30 reactivity, indicative of an activated phenotype, in 43–75% of ENKTCL.^{7,19}

Several cases in our series with multiple biopsies taken at intervals ranging from 12 to 35 months showed evidence of histological progression, including development of more typical features of ENKTCL with medium- to large-sized cells showing increased cellular pleomorphism, necrosis and proliferation index. This suggests that small-cell predominant tumours may represent an early manifestation of ENKTCL, particularly when the clinical symptoms mimic closely benign sinonasal disease with nasal congestion and obstruction and no mass lesion is identifiable by clinical examination or imaging. Few studies have reported clinical differences among histological subtypes of ENKTCL. Kuo *et al.* reported a younger median age at diagnosis in patients whose tumours contained mainly small or medium-sized cells (43 years, similar to 48 years in our series) compared to those with large or pleomorphic cells (60–72 years), but their study did not show any correlation between histology and survival.⁴ While Pongpruttipan *et al.* showed a trend towards better OS in patients whose tumours had a small-cell component, defined as at least 25% of neoplastic cells, versus those whose tumours lacked a small-cell component, only three patients in their series had small-cell predominant tumours (>90% neoplastic cells), precluding a meaningful survival analysis in this specific subgroup.¹⁹ Interestingly, we noted an apparent association in our series between Caucasian ethnicity, older age at diagnosis and T lineage disease, a finding that, to our knowledge, has not been reported previously. Due to the small number of cases in our series, this finding requires confirmation in larger studies.

Given that survival in ENKTCL is correlated strongly with stage and presence of extranasal disease,^{7,19–22} early detection is optimal and would probably contribute to improved prognosis. Three of four patients with fatal outcome in our cohort had stage IV disease at diagnosis and three had extranasal primary tumours involving buccal mucosa, suggesting that these risk factors apply similarly to cases with small-cell predominance and that the bland histology in such cases does not portend a better outcome. The significantly worse OS in the three

patients with primary buccal disease relates not only to their extranasal location, but also to disease stage and/or limited initial therapy. Two of these patients presented with stage IV disease and the third, with long-standing facial swelling before development of a mass lesion, was treated only with localized radiotherapy prior to disease progression. While radiotherapy has been the mainstay of treatment for patients with localized nasal disease, two Japanese studies have shown improved survival in patients with localized nasal ENKTCL who received combined-modality chemoradiotherapy compared to radiotherapy alone.^{21,23} Progress has also been made in the treatment of stage IV ENKTCL, although outcome for these patients remains significantly inferior to those with localized disease treated with radiation with or without chemotherapy. For sufficiently fit stage IV patients, SMILE [steroid (dexamethasone), methotrexate, ifosfamide, L-asparaginase and etoposide] produces a 1-year survival of 55%, which is improved compared to historical series.²⁴ These studies and the poorer outcomes noted in our patients with advanced-stage and extranasal disease underscore the importance of early recognition of the diagnosis and initiation of appropriate therapy prior to tumour dissemination.

In conclusion, we report 13 patients with small-cell predominant ENKTCL diagnosed in the West, nearly half of whom were Caucasian. In several patients with multiple biopsies, the diagnosis was delayed for up to 3 years due to the deceptively bland cytomorphology and admixed inflammatory cell background. The findings of even focal dense hypercellularity, focal surface ulceration or microscopic bone invasion should alert the pathologist to the possibility of small-cell predominant ENKTCL in routine sinonasal biopsies, even when there is no clinical suspicion or identifiable mass lesion. Screening of such cases by EBER *in-situ* hybridization followed by confirmatory immunohistochemistry to characterize further the lymphoma should prevent a misdiagnosis, leading to earlier institution of therapy and possible improvement in patient outcome.

Acknowledgements

The authors are grateful to the pathologists who referred cases in consultation and who provided follow-up information, including Dr Kathryn Foucar, Dr Darlene Knapp, Dr Richard Meyer, Dr Philip Munoz, Dr Samuel Smoot, Dr Janusz Starakiewicz, Dr Jeffrey Sussman, Dr Peter Tsvivis and Dr Scott Wenson, as

well as to the following clinicians for providing additional follow-up information: Dr Tak Takvorian, Dr Jerry M. Schreiberstein, Dr Bruce Selden and Dr Presley Mock. The authors would also like to thank Ms Michelle Forrestall Lee and Mr Stephen Conley for assistance with photography.

Conflicts of interest

The authors declare that they have no significant relationships with, or financial interest in, any commercial companies pertaining to this paper.

References

1. Chan JK. Natural killer cell neoplasms. *Anat. Pathol.* 1998; **3**: 77–145.
2. Cheung MM, Chan JK, Wong KF. Natural killer cell neoplasms: a distinctive group of highly aggressive lymphomas/leukemias. *Semin. Hematol.* 2003; **40**: 221–232.
3. Quintanilla-Martinez L, Franklin JL, Guerrero I *et al.* Histological and immunophenotypic profile of nasal NK/T cell lymphomas from Peru: high prevalence of p53 overexpression. *Hum. Pathol.* 1999; **30**: 849–855.
4. Kuo TT, Shih LY, Tsang NM. Nasal NK/T cell lymphoma in Taiwan: a clinicopathologic study of 22 cases, with analysis of histologic subtypes, Epstein-Barr virus LMP-1 gene association, and treatment modalities. *Int. J. Surg. Pathol.* 2004; **12**: 375–387.
5. Chan JKC, Quintanilla-Martinez L, Ferry JA, Peh SC. Extranodal NK/T-cell lymphoma, nasal type. In Swerdlow SH, Campo E, Harris NL *et al.* eds. *WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues*. 4th ed. Lyon: IARC Press, 2008; 285–288.
6. Hasserjian RP, Harris NL. NK-cell lymphomas and leukemias: a spectrum of tumors with variable manifestations and immunophenotype. *Am. J. Clin. Pathol.* 2007; **127**: 860–868.
7. Li S, Feng X, Li T *et al.* Extranodal NK/T-cell lymphoma, nasal type: a report of 73 cases at MD Anderson Cancer Center. *Am. J. Surg. Pathol.* 2013; **37**: 14–23.
8. Sohani AR, Krings G, Hasserjian RP, Pilch BZ, Harris NL, Ferry JA. LS111: extranodal NK/T-cell lymphoma with a predominance of small cells: challenging diagnosis of a putative early lesion (abstract). XVth Meeting of the European Association for Haematopathology Abstract and Workshop Book 2010: 93.
9. Cuadra-Garcia I, Proulx G, Wu C *et al.* Sinonasal lymphoma: a clinicopathologic analysis of 58 cases from the Massachusetts General Hospital. *Am. J. Surg. Pathol.* 1999; **23**: 1356–1369.
10. Rahemtullah A, Longtine JA, Harris NL *et al.* CD20 + T-cell lymphoma: clinicopathologic analysis of 9 cases and a review of the literature. *Am. J. Surg. Pathol.* 2008; **32**: 1593–1607.
11. Snuderl M, Kolman OK, Chen YB *et al.* B-cell lymphomas with concurrent IGH-BCL2 and MYC rearrangements are aggressive neoplasms with clinical and pathologic features distinct from Burkitt lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma. *Am. J. Surg. Pathol.* 2010; **34**: 327–340.
12. Sholl LM, Longtine J. Molecular analysis of genetic markers for non-Hodgkin lymphomas. Chapter 10: Unit 10. *Curr. Protoc. Hum. Genet.* 2010; **14**: 11–25.

13. van Dongen JJ, Langerak AW, Bruggemann M *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**: 2257–2317.
14. Cohen JI, Jaffe ES, Dale JK *et al.* Characterization and treatment of chronic active Epstein-Barr virus disease: a 28-year experience in the United States. *Blood* 2011; **117**: 5835–5849.
15. Isobe Y, Aritaka N, Setoguchi Y *et al.* T/NK cell type chronic active Epstein-Barr virus disease in adults: an underlying condition for Epstein-Barr virus-associated T/NK-cell lymphoma. *J. Clin. Pathol.* 2012; **65**: 278–282.
16. Kimura H, Ito Y, Kawabe S *et al.* EBV-associated T/NK-cell lymphoproliferative diseases in nonimmunocompromised hosts: prospective analysis of 108 cases. *Blood* 2012; **119**: 673–686.
17. Okano M, Kawa K, Kimura H *et al.* Proposed guidelines for diagnosing chronic active Epstein-Barr virus infection. *Am. J. Hematol.* 2005; **80**: 64–69.
18. Quintanilla-Martinez L, Kumar S, Fend F *et al.* Fulminant EBV (+) T-cell lymphoproliferative disorder following acute/chronic EBV infection: a distinct clinicopathologic syndrome. *Blood* 2000; **96**: 443–451.
19. Pongpruttipan T, Sukpanichnant S, Assanasen T *et al.* Extranodal NK/T-cell lymphoma, nasal type, includes cases of natural killer cell and alphabeta, gammadelta, and alphabeta/gammadelta T-cell origin: a comprehensive clinicopathologic and phenotypic study. *Am. J. Surg. Pathol.* 2012; **36**: 481–499.
20. Au WY, Weisenburger DD, Intragumtornchai T *et al.* Clinical differences between nasal and extranasal natural killer/T-cell lymphoma: a study of 136 cases from the International Peripheral T-Cell Lymphoma Project. *Blood* 2009; **113**: 3931–3937.
21. Yamaguchi M, Tobinai K, Oguchi M *et al.* Concurrent chemoradiotherapy for localized nasal natural killer/T-cell lymphoma: an updated analysis of the Japan clinical oncology group study JCOG0211. *J. Clin. Oncol.* 2012; **30**: 4044–4046.
22. Vazquez A, Khan MN, Blake DM, Sanghvi S, Baredes S, Eloy JA. Extranodal natural killer/T-Cell lymphoma: a population-based comparison of sinonasal and extranasal disease. *Laryngoscope* 2014; **124**: 888–895.
23. Kim SJ, Kim K, Kim BS *et al.* Phase II trial of concurrent radiation and weekly cisplatin followed by VIPD chemotherapy in newly diagnosed, stage IE to IIE, nasal, extranodal NK/T-cell lymphoma: Consortium for Improving Survival of Lymphoma study. *J. Clin. Oncol.* 2009; **27**: 6027–6032.
24. Yamaguchi M, Kwong YL, Kim WS *et al.* Phase II study of SMILE chemotherapy for newly diagnosed stage IV, relapsed, or refractory extranodal natural killer (NK)/T-cell lymphoma, nasal type: the NK-Cell Tumor Study Group study. *J. Clin. Oncol.* 2011; **29**: 4410–4416.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Data S1. Additional details related to materials and methods.

VI.- DISCUSSIÓ

1.- Limfoma fol·licular primari cutani versus secundari.

El limfoma fol·licular primari cutani (LFPC) és un limfoma de pronòstic clínic indolent caracteritzat per freqüents recaigudes cutànies i amb una baixa incidència de disseminació sistèmica (Kim, *et al* 2005, Willemze, *et al* 2005). Aquest limfoma va ser inclòs a la classificació de limfomes cutanis de la EORTC l'any 1997 però no ho va ser a la classificació de limfomes de la OMS publicada l'any 2001. A la descripció original el LFPC era un limfoma molt diferent dels altres limfomes fol·liculars, sent CD10 negatiu, rarament expressava bcl2 i no presentava la translocació t(14;18) (Willemze, *et al* 1997). Estudis posteriors han demostrat un espectre fenotípic i genotípic més ampli, amb més similitats als altres limfomes fol·liculars, pel que fa a més expressió de CD10, bcl2 i inclús alguns casos amb reordenaments de BCL2. Estudis mutacionals han estat utilitzats per descriure la naturalesa distintiva dels limfomes B primaris cutanis. Hi ha recents estudis en limfoma de la zona marginal primari cutani (Maurus, *et al* 2018) i en el limfoma b difús de cèl·lules grans primari cutani de tipus les cames (Mareschal, *et al* 2017). Nogensmenys, les dades pel que fa al LFPC són més limitades. Molt recentment s'ha descrit el panorama mutacional dels LFPC en una sèrie retrospectiva de casos. Els LFPC presenten similitats amb el LF-NOS i també amb d'altres limfomes fol·liculars BCL2 no reordenats, especialment els que apareixen en territoris extranodals. No presenten mutacions a la via de MAP2K1, una de les més freqüents detectades al LF de tipus pediàtric (Barasch, *et al* 2020). Aquest estudi és encoratjador i recomana incloure els casos de LFPC en els futurs estudis que ens ajudin a caracteritzar millor els casos de limfoma fol·licular en general i

ajudin també a tenir una aproximació terapèutica més correcta, independentment de la localització del limfoma.

D'acord amb les recomanacions de l'OMS/EORTC, el tractament dels primaris cutanis ha de basar-se en teràpies dirigides directament a la pell, sent el tractament més utilitzat la radioteràpia i el tractament quirúrgic (Senff, *et al* 2008b). D'altra banda, els casos de limfoma fol·licular amb afectació secundària tenen pitjor pronòstic i són candidats a tractament quimioteràpic sistèmic.

Les lesions cutànies poden ser la manifestació clínica inicial en pacients amb limfoma fol·licular sistèmic i en aquesta situació en particular, les troballes a nivell de la pell poden ser molt similars a les del limfoma fol·licular primari cutani, tant a nivell clínic com histològic (Kim, *et al* 2005). El diagnòstic definitiu de vegades s'ha d'establir després d'un examen clínic complet, l'avaluació curosa de les troballes immunohistoquímiques i genètiques i amb un sistematitzat estadiatge del pacient. Així i tot, en molts pacients amb afectació cutània per un limfoma sistèmic, l'afectació sistèmica a nivell ganglionar pot ser molt incipient i difícil de detectar amb l'estadiatge inicial.

A la sèrie de pacients nostra que consta de 81 casos, els primaris cutanis tenien una edat mitjana de 57 anys, lleugerament més joves que els secundaris, que la seva mitjana era de 65 anys. No vam detectar diferències clíniques significatives en quant a la presentació clínica, el tipus i la distribució de les lesions a la pell. Les lesions, tant en els primaris com en els secundaris, estaven caracteritzades per lesions nodulotumorals afectant cara, coll i cuir cabellut. De tota manera, entre els nostres casos de primaris cutanis, l'afectació

del tronc es va veure més freqüentment del descrit a la literatura (Suarez, *et al* 2013, Willemze, *et al* 2005). A la nostra sèrie, ni la presència de lesions multifocals (T3) ni l'afectació de les cames va ser associada a un pitjor pronòstic. Una possible explicació per aquest fet, i una limitació del nostre estudi és que es tracta de processos indolents i seria necessari un seguiment molt llarg per poder detectar aquestes diferències.

A pesar de la resposta favorable inicial al tractament, els primaris cutanis van presentar una alta incidència de recaigudes (40%). La disseminació extracutània durant el seguiment es va veure en 5 casos (9%). Aquesta incidència va ser lleugerament superior a la descrita a la literatura (Senff, *et al* 2008b, Willemze, *et al* 2005). Aquest pacients en particular no van mostrar diferències en quant a la clínica i a les troballes histològiques respecte als altres casos primaris cutanis. I a diferència dels casos secundaris, la majoria dels primaris cutanis estaven vius i lliures de malaltia al final del nostre estudi.

Per que fa a les troballes histològiques, tant els casos primaris com els secundaris eren molt similars amb l'estudi d'hematoxilina eosina. Als dos grups l'infiltrat tendia a estar disposat en un patró nodular o difús. Citològicament en els dos grups la cel·lularitat era una barreja de centròcits i centroblastes amb un cert predomini de centròcits grans. En quant a l'estudi immunohistoquímic, no vam observar diferències en l'expressió de bcl6 entre els casos primaris i els secundaris. Pel contrari, sí que vam observar discrepàncies pel que fa a l'expressió de CD10 i bcl2. A pesar del que les descripcions originals d'aquesta entitat deien que a diferència dels limfomes fol·liculars sistèmics, el primari cutani era negatiu o molt rarament positiu a bcl2 (Willemze, *et al* 2005), alguns estudis posteriors presentaven resultats contradictoris, reportant expressió de

bcl2 per immunohistoquímica i inclús descrivint reordenaments del gen BCL2 (Kim, *et al* 2005, Streubel, *et al* 2006, Szablewski, *et al* 2016). Aquestes discrepàncies poden basar-se en interpretacions diferents de l'expressió antigènica per part de les cèl·lules neoplàstiques. A les nostres mans 69% i 66% dels casos primaris cutanis presentaven expressió de bcl2 i CD10, respectivament. Nogensmenys, quan nosaltres avaluàvem la intensitat en l'expressió de bcl2, hi trobàvem diferències significatives entre els dos grups i destacava l'expressió intensa restringida quasi exclusivament al grup de limfomes secundaris. Pel que fa a l'expressió de CD10, la intensitat en l'expressió no va resultar tan útil com amb el bcl2 que ens ajudava a distingir els dos grups. CD10 era expressat de manera intensa en 16% dels casos primaris i de forma molt similar al grup de secundaris. Creem que les diferències en l'expressió de bcl2 i CD10 en aquest estudi i comparant-lo amb la literatura més antiga, poden ser explicades per la millora en les tècniques de desemmascament antigènic dels laboratoris d'anatomia patològica.

Estudis previs van proposar que la t(14;18) era uniformement negativa en els casos de limfomes fol·liculars primaris cutanis (Cerroni, *et al* 2000). No obstant això, estudis recents han identificat la t(14;18) en una incidència que oscil·la entre un 1 i un 40% (Lucioni, *et al* 2016, Volkenandt, *et al* 1992). Aquestes diferències han sigut atribuïdes a diferents mètodes utilitzats per la seva detecció, com la reacció en cadena de la polimerasa (PCR) i la hibridació in situ fluorescent (FISH). Al nostre estudi, nosaltres vam poder realitzar l'estudi de FISH de BCL2 a un grup de 58 casos (44 primaris cutanis i 14 secundaris cutanis). En concordança amb la literatura, vam identificar una alta prevalença de reordenaments en els casos secundaris, concretament a 68% dels

estudiats. De forma interessant, també la vam detectar a 4 dels 44 casos primaris estudiats, el que representava un 9% dels mateixos. El significat pronòstic del reordenament de BCL2 en els casos primaris roman en controvèrsia, i alguns autors suggerien un pitjor pronòstic i més risc de disseminació extracutània d'aquests casos (Abdul-Wahab, *et al* 2014, Pham-Ledard, *et al* 2015).

En conclusió, els nostres resultats confirmen que bcl2 i CD10 es troben significativament expressats en la majoria dels casos de limfoma fol·licular primari cutani i que la intensitat en l'expressió de bcl2 és la clau en la diferenciació histopatològica entre els casos primaris i els secundaris.

2.- Limfoma NK/T extranodal de tipus nasal de predomini de cèl·lula petita.

El LCTNKE de predomini de cèl·lula petita està ben reconegut a les àrees endèmiques amb una alta prevalença en limfomes relacionats amb EBV, però a Amèrica i a Europa, el diagnòstic potser passar per alt, sobretot si no hi ha una massa o una sospita de malignitat (Quintanilla-Martinez, *et al* 1999). La nostra sèrie inclou casos on el diagnòstic es va endarrerir fins a 3 anys per la presència de una cel·lularitat amb poca atípia, amb baix índex proliferatiu i associada a un acompanyament cel·lular inflamatori ric amb histiòcits, cèl·lules plasmàtiques i eosinòfils. A cinc dels 13 pacients (38%), el diagnòstic no es va realitzar a la primera biòpsia, el procés es va confondre amb un procés inflamatori crònic. A més, aquests casos alteraven poc l'arquitectura del teixit. Les troballes més agressives com necrosi tumoral, angiòinvasió i angiòdestrucció, que són comuns a la forma típica de LCTNKE, les vam trobar només en un 17-22% de les biòpsies estudiades. Les claus en el diagnòstic d'aquesta forma predominantment de cèl·lula petita són la hipercel·lularitat focal, l'ulceració superficial o la necrosi i la invasió microscòpica de l'os. Alguns casos poden mostrar una mica d'atípia citològica amb cèl·lules una mica més grans que un limfòcit normal i un nucli lleugerament irregular. Aquestes troballes, encara que subtils, haurien d'alertar al patòleg que estudia el cas i fer pensar en aquesta entitat estudiant la positivitat de les cèl·lules al VEB i posteriorment els marcadors de cèl·lula T, NK i de grànuls citotòxics, per confirmar el diagnòstic.

A més d'aquestes diferències morfològiques, els casos de LCTNKE mostren també diferències immunohistoquímiques que els diferencien dels casos amb histologia típica. L'índex de proliferació valorat amb Ki67 era baix en la nostra sèries, en un rang que anava de menys del 5% al 10% en la majoria de les biòpsies inicials. Només un cas presentava un ki67 inicial del 30%. Per contra, en una sèrie gran d'Estats Units, la mitjana de proliferació era del 50%. Només un 21% dels casos presentaven un índex proliferatiu menor al 30% (Li, *et al* 2013). CD30 va ser negatiu a tots els casos estudiats de la nostra sèrie. Aquesta dada és també diferent de les sèries publicades a la literatura on la positivitat oscil·la entre un 43-75% dels casos (Li, *et al* 2013, Pongpruttipan, *et al* 2012).

Diversos casos de la nostra sèrie que presentaven múltiples biòpsies preses en intervals que oscil·laven de 12 a 15 mesos i que mostraven una evident progressió histològica, incloent el desenvolupament de troballes més típiques amb cèl·lules més grans i atípiques, necrosi i alt índex proliferatiu. Això suggereix que la variant de predomini de cèl·lula petita pot representar una manifestació inicial del LCTNKE. Pocs estudis han descrit diferències clíniques entre els subtipus histològics de LCTNKE. Kuo *et al* van descriure una mitjana d'edat al diagnòstic més jove en els pacients que tenien la cel·lularitat més petita, 43 anys, comparada amb els de cèl·lules grans i pleomòrfiques que la mitjana d'edat era d'entre 60 i 72 anys. En aquell estudi però no es descriu cap correlació entre la histologia i la supervivència (Kuo, *et al* 2004). De manera interessant, nosaltres hem apreciat una aparent associació entre la ètnia Caucàsica, l'edat gran al diagnòstic i el fenotip T, una troballa que fins ara no

estava descrita prèviament. Aquesta associació hauria de ser confirmada en sèries més grans.

Donat que la supervivència està fortament relacionada amb l'estadi i la presència de malaltia extranasal (Li, *et al* 2013, Pongpruttipan, *et al* 2012), la detecció precoç de la malaltia és molt important i molt probablement millorarà el pronòstic del pacient. Tres dels quatre pacients de la nostra sèrie amb un pèssim pronòstic presentaven estadi IV al diagnòstic i 3 tenien tumors primàriament extranasals afectant la mucosa oral, suggerint que aquest factor, el de l'estadiatge, afecta en el pronòstic d'igual forma en els casos amb histologia clàssica i els de predomini de cèl·lula petita. La pitjor supervivència global dels 3 casos amb afectació primària a la mucosa de la boca es relaciona no només amb l'afectació extranasal, sinó també amb l'estadiatge de la malaltia i/o amb la teràpia inicial limitada. Dos d'aquests pacients es van presentar en estadi IV i el tercer, va ser tractat només amb radioteràpia local abans de la progressió de la malaltia.

En dos casos de la sèrie, casos 9 i 13, el diagnòstic es va endarrerir 14 i 34 mesos respectivament. En els dos casos va haver una significativa progressió de la malaltia. Inicialment la citologia era pràcticament sense atípia i amb un Ki67 molt baix i després en la progressió la citologia ja va ser atípica i l'índex de proliferació ja va ser de més del 50%. El cas 13 va ser diagnosticat a nivell d'una biòpsia cutània. La lesió cutània tenia morfologia clàssica de LCTNKE amb índex proliferatiu alt. Va ser arrel del diagnòstic que es va realitzar una biòpsia dels sins nasals i es va poder veure la cel·lularitat amb poca atípia i amb un fenotip lleugerament diferent. La revisió retrospectiva de biòpsies

prèvies realitzades 3 anys abans de la presentació cutània van confirmar també el diagnòstic de limfoma amb la variant que descrivim.

En conclusió, hem descrit 13 casos de LCTNKE amb predomini de cèl·lula petita diagnosticats a Europa i Estats Units. Diversos d'aquests pacients presentaven múltiples biòpsies, i el diagnòstic del cas es va retardar fins a 3 anys degut a la citologia tan poc atípica i la barreja del component inflamatori crònic. Les troballes de hiperce·l·lularitat focal, ulceració superficial focal o invasió microscòpica de l'os, haurien d'alertar al patòleg que estudia el cas, de que es tracta d'un LCTNKE de predomini de cèl·lula petita, inclús quan no hi ha sospita clínica de tumor o no s'identifica una lesió en forma de massa. L'estudi d'aquests casos amb hibridació in situ del VEB i panell immunohistoquímic per confirmar el diagnòstic de limfoma, ajudarà a no retardar el diagnòstic i el tractament d'aquests casos. Iniciar d'hora el tractament quimioteràpic possiblement millorarà el pronòstic d'aquest grup de pacients.

VII.- CONCLUSIONS

1.- Conclusions del limfoma fol·licular primari cutani versus secundari.

1.1.- L'estudi clinicopatològic a la sèrie de pacients diagnosticats amb limfoma fol·licular d'afectació primària i secundària confirma que bcl2 i CD10 es troben significativament expressats en la majoria de casos amb afectació primària.

1.2.- L'estudi immunohistoquímic demostra que la intensitat d'expressió del bcl2 és la dada més significativa en la diferenciació dels casos primaris dels secundaris.

2.- Conclusions del LCTNKE de predomini de cèl·lula petita.

2.1.- L'estudi clinicopatològic dels casos de LCTNKE de predomini de cèl·lula petita ha identificat les característiques de sospita de limfoma que són: la hipercel·lularitat encara que sigui focal, la ulceració superficial i la invasió microscòpica de l'os.

2.2.- La identificació d'aquestes característiques en biòpsies no orientades de limfoma i en localitzacions no típiques com l'afectació secundària de la pell, ajudarien a realitzar diagnòstics precoços d'aquesta variant histològica el que faria iniciar el tractament del pacient i possiblement milloraria el pronòstic del mateix.

VIII.- BIBLIOGRAFIA

- Abdul-Wahab, A., Tang, S.Y., Robson, A., Morris, S., Agar, N., Wain, E.M., Child, F., Scarisbrick, J., Neat, M. & Whittaker, S. (2014) Chromosomal anomalies in primary cutaneous follicle center cell lymphoma do not portend a poor prognosis. *J Am Acad Dermatol*, **70**, 1010-1020.
- Al-Hakeem, D.A., Fedele, S., Carlos, R. & Porter, S. (2007) Extranodal NK/T-cell lymphoma, nasal type. *Oral Oncol*, **43**, 4-14.
- Au, W.Y., Weisenburger, D.D., Intragumtornchai, T., Nakamura, S., Kim, W.S., Sng, I., Vose, J., Armitage, J.O., Liang, R. & International Peripheral, T.C.L.P. (2009) Clinical differences between nasal and extranasal natural killer/T-cell lymphoma: a study of 136 cases from the International Peripheral T-Cell Lymphoma Project. *Blood*, **113**, 3931-3937.
- Barasch, N.J.K., Liu, Y.C., Ho, J., Bailey, N., Aggarwal, N., Cook, J.R. & Swerdlow, S.H. (2020) The molecular landscape and other distinctive features of primary cutaneous follicle center lymphoma. *Hum Pathol*, **106**, 93-105.
- Cerroni, L., Arzberger, E., Putz, B., Hofler, G., Metze, D., Sander, C.A., Rose, C., Wolf, P., Rutten, A., McNiff, J.M. & Kerl, H. (2000) Primary cutaneous follicle center cell lymphoma with follicular growth pattern. *Blood*, **95**, 3922-3928.
- Chang, S.E., Kim, M.J., Lee, W.S., Kang, Y.K., Moon, K.C., Koh, J.K. & Choi, J.H. (2003) Natural killer cells in human peripheral blood and primary

cutaneous natural killer cell lymphomas may express cutaneous lymphocyte antigen. *Acta Derm Venereol*, **83**, 162-166.

Chen, X.Y., Pepper, S.D. & Arrand, J.R. (1992) Prevalence of the A and B types of Epstein-Barr virus DNA in nasopharyngeal carcinoma biopsies from southern China. *J Gen Virol*, **73 (Pt 2)**, 463-466.

Cong, P., Raffeld, M., Teruya-Feldstein, J., Sorbara, L., Pittaluga, S. & Jaffe, E.S. (2002) In situ localization of follicular lymphoma: description and analysis by laser capture microdissection. *Blood*, **99**, 3376-3382.

de Leval, L. & Jaffe, E.S. (2020) Lymphoma Classification. *Cancer J*, **26**, 176-185.

Dobashi, A., Tsuyama, N., Asaka, R., Togashi, Y., Ueda, K., Sakata, S., Baba, S., Sakamoto, K., Hatake, K. & Takeuchi, K. (2016) Frequent BCOR aberrations in extranodal NK/T-Cell lymphoma, nasal type. *Genes Chromosomes Cancer*, **55**, 460-471.

Dreyling, M., Ghielmini, M., Marcus, R., Salles, G., Vitolo, U., Ladetto, M. & Group, E.G.W. (2014) Newly diagnosed and relapsed follicular lymphoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*, **25 Suppl 3**, iii76-82.

Geller, S., Myskowski, P.L. & Pulitzer, M. (2018) NK/T-cell lymphoma, nasal type, gammadelta T-cell lymphoma, and CD8-positive epidermotropic T-

cell lymphoma-clinical and histopathologic features, differential diagnosis, and treatment. *Semin Cutan Med Surg*, **37**, 30-38.

Goodlad, J.R. (2001) Spindle-cell B-cell lymphoma presenting in the skin. *Br J Dermatol*, **145**, 313-317.

Goodlad, J.R., MacPherson, S., Jackson, R., Batstone, P., White, J., Scotland & Newcastle Lymphoma, G. (2004) Extranodal follicular lymphoma: a clinicopathological and genetic analysis of 15 cases arising at non-cutaneous extranodal sites. *Histopathology*, **44**, 268-276.

Gru, A.A. & Jaffe, E.S. (2017a) Cutaneous EBV-related lymphoproliferative disorders. *Semin Diagn Pathol*, **34**, 60-75.

Gru, A.A. & Jaffe, E.S. (2017b) The Landscape of Cutaneous Lymphomas in 2016, An Introduction. *Semin Diagn Pathol*, **34**, 1-2.

Harris, N.L., Jaffe, E.S., Stein, H., Banks, P.M., Chan, J.K., Cleary, M.L., Delsol, G., De Wolf-Peeters, C., Falini, B., Gatter, K.C. & et al. (1994) A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood*, **84**, 1361-1392.

Hope, C.B. & Pincus, L.B. (2017) Primary cutaneous B-cell lymphomas with large cell predominance-primary cutaneous follicle center lymphoma, diffuse large B-cell lymphoma, leg type and intravascular large B-cell lymphoma. *Semin Diagn Pathol*, **34**, 85-98.

- Jaffe, E.S. (1996) Classification of natural killer (NK) cell and NK-like T-cell malignancies. *Blood*, **87**, 1207-1210.
- Kim, B.K., Surti, U., Pandya, A., Cohen, J., Rabkin, M.S. & Swerdlow, S.H. (2005) Clinicopathologic, immunophenotypic, and molecular cytogenetic fluorescence in situ hybridization analysis of primary and secondary cutaneous follicular lymphomas. *Am J Surg Pathol*, **29**, 69-82.
- Kim, W.Y., Nam, S.J., Kim, S., Kim, T.M., Heo, D.S., Kim, C.W. & Jeon, Y.K. (2015) Prognostic implications of CD30 expression in extranodal natural killer/T-cell lymphoma according to treatment modalities. *Leuk Lymphoma*, **56**, 1778-1786.
- Kuo, T.T., Shih, L.Y. & Tsang, N.M. (2004) Nasal NK/T cell lymphoma in Taiwan: a clinicopathologic study of 22 cases, with analysis of histologic subtypes, Epstein-Barr virus LMP-1 gene association, and treatment modalities. *Int J Surg Pathol*, **12**, 375-387.
- Lackraj, T., Goswami, R. & Kridel, R. (2018) Pathogenesis of follicular lymphoma. *Best Pract Res Clin Haematol*, **31**, 2-14.
- Lee, S., Park, H.Y., Kang, S.Y., Kim, S.J., Hwang, J., Lee, S., Kwak, S.H., Park, K.S., Yoo, H.Y., Kim, W.S., Kim, J.I. & Ko, Y.H. (2015) Genetic alterations of JAK/STAT cascade and histone modification in extranodal NK/T-cell lymphoma nasal type. *Oncotarget*, **6**, 17764-17776.

Li, S., Feng, X., Li, T., Zhang, S., Zuo, Z., Lin, P., Konoplev, S., Bueso-Ramos, C.E., Vega, F., Medeiros, L.J. & Yin, C.C. (2013) Extranodal NK/T-cell lymphoma, nasal type: a report of 73 cases at MD Anderson Cancer Center. *Am J Surg Pathol*, **37**, 14-23.

Lucioni, M., Berti, E., Arcaini, L., Croci, G.A., Maffi, A., Klersy, C., Goteri, G., Tomasini, C., Quaglino, P., Riboni, R., Arra, M., Dallera, E., Grandi, V., Alaibac, M., Ramponi, A., Rattotti, S., Cabras, M.G., Franceschetti, S., Fraternali-Orcioni, G., Zerbinati, N., Onida, F., Ascani, S., Fierro, M.T., Rupoli, S., Gambacorta, M., Zinzani, P.L., Pimpinelli, N., Santucci, M. & Paulli, M. (2016) Primary cutaneous B-cell lymphoma other than marginal zone: clinicopathologic analysis of 161 cases: Comparison with current classification and definition of prognostic markers. *Cancer Med*, **5**, 2740-2755.

Mani, H., Climent, F., Colomo, L., Pittaluga, S., Raffeld, M. & Jaffe, E.S. (2010) Gall bladder and extrahepatic bile duct lymphomas: clinicopathological observations and biological implications. *Am J Surg Pathol*, **34**, 1277-1286.

Mareschal, S., Pham-Ledard, A., Viailly, P.J., Dubois, S., Bertrand, P., Maingonnat, C., Fontanilles, M., Bohers, E., Ruminy, P., Tournier, I., Courville, P., Lenormand, B., Duval, A.B., Andrieu, E., Verneuil, L., Vergier, B., Tilly, H., Joly, P., Frebourg, T., Beylot-Barry, M., Merlio, J.P. & Jardin, F. (2017) Identification of Somatic Mutations in Primary

Cutaneous Diffuse Large B-Cell Lymphoma, Leg Type by Massive Parallel Sequencing. *J Invest Dermatol*, **137**, 1984-1994.

Maurus, K., Appenzeller, S., Roth, S., Kuper, J., Rost, S., Meierjohann, S., Arampatzi, P., Goebeler, M., Rosenwald, A., Geissinger, E. & Wobser, M. (2018) Panel Sequencing Shows Recurrent Genetic FAS Alterations in Primary Cutaneous Marginal Zone Lymphoma. *J Invest Dermatol*, **138**, 1573-1581.

Mercadal, S., Sancho, J.M., Climent, F., Tapia, G., Pomares, H., Carro, I., Sorigue, M., Pane, M., Domingo-Domenech, E., Encuentra, M., Aguilera, C., Oliveira, A.C., Andrade, M., Fernandez de Sevilla, A., Ribera, J.M., Gonzalez-Barca, E. & Sureda, A. (2020) Long-term outcome comparing histological grades of follicular lymphoma patients treated with immunochemotherapy as first-line therapy: A retrospective analysis from two institutions. *Eur J Haematol*, **104**, 198-206.

Miranda-Filho, A., Pinos, M., Znaor, A., Marcos-Gragera, R., Steliarova-Foucher, E. & Bray, F. (2019) Global patterns and trends in the incidence of non-Hodgkin lymphoma. *Cancer Causes Control*, **30**, 489-499.

Misdraji, J., Harris, N.L., Hasserjian, R.P., Lauwers, G.Y. & Ferry, J.A. (2011) Primary follicular lymphoma of the gastrointestinal tract. *Am J Surg Pathol*, **35**, 1255-1263.

Nann, D., Ramis-Zaldivar, J.E., Muller, I., Gonzalez-Farre, B., Schmidt, J., Egan, C., Salmeron-Villalobos, J., Clot, G., Mattern, S., Otto, F., Mankel,

B., Colomer, D., Balague, O., Szablewski, V., Lome-Maldonado, C., Leoncini, L., Dojcinov, S., Chott, A., Copie-Bergman, C., Bonzheim, I., Fend, F., Jaffe, E.S., Campo, E., Salaverria, I. & Quintanilla-Martinez, L. (2020) Follicular lymphoma t(14;18)-negative is genetically a heterogeneous disease. *Blood Adv*, **4**, 5652-5665.

Novelli, S., Briones, J. & Sierra, J. (2013) Epidemiology of lymphoid malignancies: last decade update. *Springerplus*, **2**, 70.

Ott, G., Katzenberger, T., Lohr, A., Kindelberger, S., Rudiger, T., Wilhelm, M., Kalla, J., Rosenwald, A., Muller, J.G., Ott, M.M. & Muller-Hermelink, H.K. (2002) Cytomorphologic, immunohistochemical, and cytogenetic profiles of follicular lymphoma: 2 types of follicular lymphoma grade 3. *Blood*, **99**, 3806-3812.

Pham-Ledard, A., Cowppli-Bony, A., Doussau, A., Prochazkova-Carlotti, M., Laharanne, E., Jouary, T., Belaud-Rotureau, M.A., Vergier, B., Merlio, J.P. & Beylot-Barry, M. (2015) Diagnostic and prognostic value of BCL2 rearrangement in 53 patients with follicular lymphoma presenting as primary skin lesions. *Am J Clin Pathol*, **143**, 362-373.

Pongpruttipan, T., Sukpanichnant, S., Assanasen, T., Wannakrairot, P., Boonsakan, P., Kanoksil, W., Kayasut, K., Mitarnun, W., Khuhapinant, A., Bunworasate, U., Puavilai, T., Bedavanija, A., Garcia-Herrera, A., Campo, E., Cook, J.R., Choi, J. & Swerdlow, S.H. (2012) Extranodal NK/T-cell lymphoma, nasal type, includes cases of natural killer cell and alphabeta, gammadelta, and alphabeta/gammadelta T-cell origin: a

comprehensive clinicopathologic and phenotypic study. *Am J Surg Pathol*, **36**, 481-499.

Quintanilla-Martinez, L., Franklin, J.L., Guerrero, I., Krenacs, L., Naresh, K.N., Rama-Rao, C., Bhatia, K., Raffeld, M. & Magrath, I.T. (1999) Histological and immunophenotypic profile of nasal NK/T cell lymphomas from Peru: high prevalence of p53 overexpression. *Hum Pathol*, **30**, 849-855.

Schmidt, J., Salaverria, I., Haake, A., Bonzheim, I., Adam, P., Montes-Moreno, S., Piris, M.A., Fend, F., Siebert, R. & Quintanilla-Martinez, L. (2014) Increasing genomic and epigenomic complexity in the clonal evolution from in situ to manifest t(14;18)-positive follicular lymphoma. *Leukemia*, **28**, 1103-1112.

Senff, N.J., Hoefnagel, J.J., Jansen, P.M., Vermeer, M.H., van Baarlen, J., Blokx, W.A., Canninga-van Dijk, M.R., Geerts, M.L., Hebeda, K.M., Kluin, P.M., Lam, K.H., Meijer, C.J. & Willemze, R. (2007) 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*, **25**, 1581-1587.

Senff, N.J., Kluin-Nelemans, H.C. & Willemze, R. (2008a) Results of bone marrow examination in 275 patients with histological features that suggest an indolent type of cutaneous B-cell lymphoma. *Br J Haematol*, **142**, 52-56.

Senff, N.J., Noordijk, E.M., Kim, Y.H., Bagot, M., Berti, E., Cerroni, L., Dummer, R., Duvic, M., Hoppe, R.T., Pimpinelli, N., Rosen, S.T., Vermeer, M.H., Whittaker, S., Willemze, R., European Organization for, R., Treatment of, C. & International Society for Cutaneous, L. (2008b) 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*, **112**, 1600-1609.

Skala, S.L., Harms, P.W., Fullen, D.R., Brown, N.A., Tejasvi, T., Wilcox, R.A., Boyer, D.F. & Hristov, A.C. (2020) Cutaneous follicle center lymphomas with plasmacytic differentiation. *J Cutan Pathol*.

Streubel, B., Scheucher, B., Valencak, J., Huber, D., Petzelbauer, P., Trautinger, F., Weihsengruber, F., Mannhalter, C., Cerroni, L. & Chott, A. (2006) Molecular cytogenetic evidence of t(14;18)(IGH;BCL2) in a substantial proportion of primary cutaneous follicle center lymphomas. *Am J Surg Pathol*, **30**, 529-536.

Suarez, A.L., Pulitzer, M., Horwitz, S., Moskowitz, A., Querfeld, C. & Myskowski, P.L. (2013) Primary cutaneous B-cell lymphomas: part I. Clinical features, diagnosis, and classification. *J Am Acad Dermatol*, **69**, 329 e321-313; quiz 341-322.

Sun, J.C. & Lanier, L.L. (2011) NK cell development, homeostasis and function: parallels with CD8(+) T cells. *Nat Rev Immunol*, **11**, 645-657.

Swerdlow, S.H., Campo, E., Harris, N.L., Bosman, F.T., Jaffe, E.S., Lakhani, S.R. & Ohgaki, H. (2017) *WHO Classification of tumours haematopoietic and lymphoid tissues World Health Organization classification of tumours*. . International Agency for Research on Cancer (IARC), Lyon.

Szablewski, V., Ingen-Housz-Oro, S., Baia, M., Delfau-Larue, M.H., Copie-Bergman, C. & Ortonne, N. (2016) Primary Cutaneous Follicle Center Lymphomas Expressing BCL2 Protein Frequently Harbor BCL2 Gene Break and May Present 1p36 Deletion: A Study of 20 Cases. *Am J Surg Pathol*, **40**, 127-136.

Tse, E., Au-Yeung, R. & Kwong, Y.L. (2019) Recent advances in the diagnosis and treatment of natural killer/T-cell lymphomas. *Expert Rev Hematol*, **12**, 927-935.

Volkenandt, M., Cerroni, L., Rieger, E., Soyer, H.P., Koch, O., Wienecke, R., Atzpodien, J., Bertino, J.R. & Kerl, H. (1992) Analysis of the 14;18 translocation in cutaneous lymphomas using the polymerase chain reaction. *J Cutan Pathol*, **19**, 353-356.

Willemze, R., Cerroni, L., Kempf, W., Berti, E., Facchetti, F., Swerdlow, S.H. & Jaffe, E.S. (2019) The 2018 update of the WHO-EORTC classification for primary cutaneous lymphomas. *Blood*.

Willemze, R., Jaffe, E.S., Burg, G., Cerroni, L., Berti, E., Swerdlow, S.H., Ralfkiaer, E., Chimenti, S., Diaz-Perez, J.L., Duncan, L.M., Grange, F., Harris, N.L., Kempf, W., Kerl, H., Kurrer, M., Knobler, R., Pimpinelli, N.,

Sander, C., Santucci, M., Sterry, W., Vermeer, M.H., Wechsler, J., Whittaker, S. & Meijer, C.J. (2005) WHO-EORTC classification for cutaneous lymphomas. *Blood*, **105**, 3768-3785.

Willemze, R., Kerl, H., Sterry, W., Berti, E., Cerroni, L., Chimenti, S., Diaz-Perez, J.L., Geerts, M.L., Goos, M., Knobler, R., Ralfkiaer, E., Santucci, M., Smith, N., Wechsler, J., van Vloten, W.A. & Meijer, C.J. (1997) EORTC classification for primary cutaneous lymphomas: a proposal from the Cutaneous Lymphoma Study Group of the European Organization for Research and Treatment of Cancer. *Blood*, **90**, 354-371.