



VICTOR HUGO TORAL RIZO

**“HODGKIN / REED-STERNBERG-LIKE CELLS IN DIFFUSE LARGE
B CELL LYMPHOMA OF THE ORAL CAVITY:
HISTOPATHOLOGICAL, IMMUNOHISTOCHEMISTRY AND IN
SITU HYBRIDIZATION STUDY”**

**“CÉLULAS HODGKIN / REED-STERNBERG – LIKE EM LINFOMA
DIFUSO DE GRANDES CÉLULAS B DE BOCA: ESTUDO
HISTOPATOLÓGICO, IMUNOISTOQUÍMICO E DE
HIBRIDIZAÇÃO IN SITU”**

PIRACICABA

2013



UNIVERSIDAD ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

VICTOR HUGO TORAL RIZO

**“HODGKIN / REED-STERNBERG-LIKE CELLS IN DIFFUSE LARGE B CELL
LYMPHOMA OF THE ORAL CAVITY: HISTOPATHOLOGICAL,
IMMUNOHISTOCHEMISTRY AND, IN SITU HYBRIDIZATION, STUDY”**

Orientador: Prof. Oslei Paes de Almeida

**“CÉLULAS HODGKIN / REED-STERNBERG – LIKE EM LINFOMA DIFUSO DE
GRANDES CÉLULAS B DE BOCA: ESTUDO HISTOPATOLÓGICO,
IMUNOISTOQUÍMICO E DE HIBRIDIZAÇÃO IN SITU”**

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutor em Estomatopatologia na Área de Patologia.

Doctorate thesis presented to Piracicaba Dental School of the University of Campinas to obtain the Ph.D. grade in Stomatopathology in the pathology area.

Este exemplar corresponde à versão final da tese defendida pelo aluno Victor Hugo Toral Rizo, e orientada pelo Prof. Dr. Oslei Paes de Almeida.

Assinatura do Orientador

PIRACICABA

2013

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba
Josidelma Francisca Costa de Souza - CRB 8/5894

T63c Toral Rizo, Victor Hugo, 1977-
Células de Hodgkin/Reed-Sternberg-like em linfoma difuso de grandes células B de boca : estudo histopatológico, imunoistoquímico e de hibridização in situ. / Victor Hugo Toral Rizo. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Oslei Paes de Almeida.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Imunoistoquímica. 2. Doença de Hodgkin. 3. Linfoma difuso de grandes células B. 4. Neoplasias bucais. 5. Neovascularização. I. Almeida, Oslei Paes de, 1948-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Hodgkin / Reed-Sternberg-like cells in diffuse large B cell lymphoma of the oral cavity : histopathological, immunohistochemistry and in situ hybridization study.

Palavras-chave em inglês:

Immunohistochemical

Hodgkin disease

Diffuse large B-cell lymphoma

Mouth neoplasms

Neovascularization

Área de concentração: Patologia

Titulação: Doutor em Estomatopatologia

Banca examinadora:

Oslei Paes de Almeida [Orientador]

Fábio de Abreu Alves

Márcio Ajudarte Lopes

Adriele Ferreira Gouvêa Vasconcellos

Ricardo Della Coletta

Data de defesa: 02-07-2013

Programa de Pós-Graduação: Estomatopatologia



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de Doutorado, em sessão pública realizada em 02 de Julho de 2013, considerou o candidato VICTOR HUGO TORAL RIZO aprovado.

Prof. Dr. OSLEI PAES DE ALMEIDA

Prof. Dr. FABIO DE ABREU ALVES

Prof. Dr. MARCIO AJUDARTE LOPES

Profa. Dra. ADRIELE FERREIRA GOUVÊA VASCONCELLOS

Prof. Dr. RICARDO DELLA COLETTA

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a meus pais, **Victor Toral Aguayo** e **María Dolores Rizo Medina**, exemplos de amor, fé, trabalho, esforço e também pelo apoio que me deram para alcançar minhas metas. Com todo meu amor serei eternamente grato.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

A minha irmã **Ana Vanesa** e seu esposo **Carlos**, pelos conselhos sempre constantes e sinceros e por fazerem parte da minha vida.

A minha família: **avós, tios e primos** pela ajuda incondicional. Obrigado.

Ao Prof. **Oslei** pela amizade, ensino e paciência, sabedoria e dedicação à procura do conhecimento.

Ao Prof. **Adalberto Mosqueda Taylor** por ter acreditado em mim.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho de dissertação foi realizado com a ajuda de várias pessoas e instituições, dentre as quais gostaria de agradecer:

À **Universidade Estadual de Campinas** por meio do seu Magnífico Reitor, **Prof. Dr. José Tadeu Jorge**.

À **Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas**, na pessoa de seu diretor, **Prof. Dr. Jacks Jorge Junior**.

À coordenadora dos cursos de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, **Profa. Dra. Renata Cunha Matheus Rodrigues Garcia**.

Ao coordenador do programa de Pós-Graduação em Estomatopatologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, **Prof. Dr. Alan Roger Santos Silva**.

Aos **Profs. Drs. Oslei Paes de Almeida, Edgard Graner, Ricardo Della Coletta, Márcio Ajudarte Lopes, Pablo Agustin Vargas, Jacks Jorge Júnior e Alan Roger Santos Silva** professores das áreas de Patologia e Semiologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP, por todos os ensinamentos transmitidos.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, (CAPES)** pela concessão de bolsa de estudos.

Nenhum dever é mais importante que a gratidão.

Aos **Profs. Wilson Delgado, Jorge Esquiche León, José Mario Palma Guzmán**, pelo suporte e prestabilidade durante este trabalho.

À **Raquel Moreira, Carina Lopes, Daniela Cristina Miyagaki, Eliana Marques, Lara Christie Monteiro Abenanti**, não tenho palavras para descrever a eterna gratidão por sua paciência e compreensão comigo.

Aos funcionários do laboratório de Patologia, **Geovania Caldas Almedia, Adriano Luís Martins, João Carlos Gomes da Silva Júnior, Fabiana F. Casarotti** e em especial à **Ana Cristina do Amaral Godoy**, por compartilhar seus conhecimentos e pela amizade. A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos **amigos e colegas da pós-graduação em Estomatopatologia**, pela agradável convivência. Muito obrigado a cada um de vocês.

A todos que em algum momento estiveram ao meu lado nesta jornada, meus mais sinceros agradecimentos.

RESUMO

O linfoma difuso de grandes células B (LDGCB) é o linfoma da cavidade bucal mais comum. Alguns dos LDGCB podem apresentar células grandes morfológicamente similares às células Hodgkin e Reed/Sternberg (HRS) dos linfomas de Hodgkin clássico (LHC). O objetivo deste estudo foi comparar os LDGCB bucal que apresentem células HRS-like (LDGCB-HRS) com o linfoma de Hodgkin primário nodal, considerando os aspectos histológicos e imunoistoquímicos (IQs), angiogênese, índice de mastócitos e células dendríticas (CD), por meio de um amplo painel IQ. Quize casos foram estudados, nos quais sete eram LDGCB-HRS like e oito eram LHC nodal. Para a análise dos aspectos histológicos e IQs foram utilizados os seguintes anticorpos: CD3, CD15, CD20, CD30, CD43, LCA, CD45RO, CD79a, CD83, EMA, MUM-1, PAX-5, perforina, granzyme B, FASN, Ki-67, LMP-1; e EBER1/2. Já para a análise da angiogênese foram utilizados os anticorpos CD34, CD31, D2-40, CD105, vWF e VEGF; e para o índice de mastócitos utilizou-se o mast cell triptase. Finalmente, para avaliar a expressão IQ das CD os anticorpos CD1a, CD83, CD123, CD207, S-100 e FXIIIa foram utilizados. Todas as lâminas foram escaneadas e as células HRS-like, mastócitos e CD imunopositivas foram analisados, assim como os parâmetros morfométricos da angiogênese. Os resultados mostraram que a imunoexpressão foi positiva em 100% de casos de LHC e em 57% dos casos de LDGCB de boca, enquanto que LCA, CD20 e CD79a foram exclusivos para todos os LDGCB, e apenas CD15 foi exclusivo para os LHC. Angiogênese e o índice de mastócitos estavam aumentados em ambas as lesões, e entre elas, o LHC obteve maiores valores que o LDGCB da cavidade bucal em todos os anticorpos analisados. Por fim, o índice de CDs foram estatisticamente significante entre os grupos, exceto para CD83, que não mostrou nenhuma diferença estatística. A distribuição de CD foi reconhecida principalmente na área tumoral e ao redor das células neoplásicas em ambas as entidades. Foi possível concluir que os LDGCB com células HRS-like da cavidade bucal devem ser incluídos no diagnóstico diferencial de LHC da cavidade bucal. Quando da avaliação destes casos, a análise morfológica detalhada assim como o uso de um amplo painel de IQ são recomendados para realizar o diagnóstico correto. A angiogênese é essencial para o desenvolvimento de LDGCB da cavidade bucal, e quaisquer dos anticorpos CD34, CD31 e

vWF podem ser utilizados para avaliar os parâmetros morfométricos. A presença significativa de CD nestes linfomas provavelmente desempenha um papel patologicamente relevante nos linfomas. Nossos resultados sugerem que o aumento no número de CD parece ser um fator contribuinte para a resposta imune estimulada pelo crescimento tumoral.

Palavras-chave: imunistoquímica; linfoma de Hodgkin; cavidade bucal; linfoma difuso de grandes células B, células Hodgkin/Reed-Sternberg like; angiogênese; células dendríticas.

ABSTRACT

Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) is the most common oral lymphoma. Some DLBCLs can present large cells morphologically similar to Hodgkin and Reed-Sternberg (HRS) cells of classical Hodgkin lymphoma (cHL). The objective of this study was to compare oral DLBCL presenting HRS-like cells (DLBCL-HRS like) with primary nodal cHL, considering the following aspects: histological and immunohistochemical (IHC), angiogenesis, index of mast cells and dendritic cells (DCs); through a broad immunohistochemical panel. Fifteen cases were studied, of which, seven were DLBCL-HRS like and eight were nodal cHL. For histological and IHC aspects, immunoreexpression of CD3, CD15, CD20, CD30, CD43, LCA, CD45RO, CD79a, CD83, EMA, MUM-1, PAX-5, perforin, granzyme B, FASN, Ki-67, LMP-1; and EBER1/2, were assessed. As for angiogenesis analysis, the antibodies used were CD34, CD31, D2-40, CD105, vWF and VEGF; and for the index of mast cell were used the mast cell tryptase. Finally, for IHC expression of DCs, the antibodies used were CD1a, CD83, CD123, CD207, S-100, and FXIIIa. All slides were scanned and positive immunoreactive cells HRS-like, mast cell and DCs were analyzed, as well as morphometric parameters of angiogenesis. The results showed that the immunoreexpression of CD30 was 100% positive in cHL and 57% in oral DLBCL HRS-like, while LCA, CD20 and CD79a were exclusive for all oral DLBCL, and only CD15 was exclusive for cHL. Angiogenesis and mast cell index values were increased in both lesions and between them, cHL was greater than oral DLBCL with all antibodies studied. Finally, DC subsets were statistically significant between groups, except CD83, which did not show statistical significance. The distribution of DCs was mainly in the tumor area, around neoplastic cells in both entities. It was possible to conclude that DLBCL-HRS should be included in the differential diagnosis of oral cHL. When evaluating these cases, a detailed morphologic and a broad IHC analyses for the correct diagnosis are recommended. Angiogenesis is essential to the development of DLBCL of the oral cavity and any of the antibodies CD34, CD31 and vWF could be used to evaluate morphometric parameters. The presence of significantly higher numbers of DCs in these lymphomas could suggest that these cells are likely to play a pathological relevant role in lymphomas.

Our findings suggest that increased number of DCs in lymphomas appears to be a factor contributing to the immune response against tumor growth.

Key-Words: Immunohistochemical; Hodgkin lymphoma; oral cavity; diffuse large B-cell lymphoma; Hodgkin/Reed-Sternberg-like cells; angiogenesis; dendritic cells.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	1
REVISÃO DA LITERATURA	5
CAPÍTULO 1:	
“Oral diffuse large B-cell lymphoma with Hodgkin/Reed–Sternberg-like cells: a comparative study”	39
CAPÍTULO 2:	
“Oral diffuse large B-cell lymphoma with Hodgkin/Reed–Sternberg-like cells and nodal classical Hodgkin lymphoma: a comparative study of angiogenesis and mast cell infiltration”	59
CAPÍTULO 3:	
“Oral diffuse large B-cell lymphoma with Hodgkin/Reed–Sternberg-like cells and nodal classical Hodgkin lymphoma: a comparative study of dendritic cells”	79
CONCLUSÃO	99
REFERÊNCIAS	101
ANEXO 1 - Anexo 1 – Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa	115

INTRODUÇÃO

Linfoma é o termo usado para um conjunto complexo de neoplasias originadas dos tecidos linfóides, o qual é classificado em duas grandes categorias: linfomas de Hodgkin (LH) e linfomas não-Hodgkin (LNH) (Swerdlow *et al.* 2008). Porém, nas duas últimas décadas, através da imunologia e biologia molecular, houve rápidos e importantes avanços na área dos linfomas, incluindo-se melhor conhecimento da função e a origem dos linfócitos. Estes avanços se refletiram em mudanças conceituais na nomenclatura e classificação dos mesmos (Higgins *et al.* 2008, Swerdlow *et al.* 2008, Ioachim and Madeiros 2009), e atualmente, sua classificação é extensa, sendo que muitas entidades foram incluídas recentemente, e outras como o LH e o linfoma de grandes células B são reconhecidas por mais de um século. Na década de 1970 iniciou-se o uso de métodos imunológicos para a classificação dos linfomas, e várias classificações foram sugeridas e utilizadas, até a mais recente publicada em 2008 pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (Swerdlow *et al.* 2008).

Os linfomas são diagnosticados por meio da morfologia, expressão de moléculas e alterações genéticas, com auxílio de várias técnicas como a imunoistoquímica (IQ), hibridização *in situ* (ISH), reação em cadeia da polimerase (PCR) e genotipagem (Ioachim *et al.* 2009). No entanto, em alguns casos o diagnóstico é feito principalmente pela morfologia e imunofenotipagem, com uso de amplo painel de marcadores IQs (Swerdlow *et al.* 2008). Alguns anticorpos estão associados a neoplasias específicas, mas mesmo nestes casos há exceções devido a marcações aberrantes ou variantes dos casos clássicos. Como exemplo, pode ser citado o anticorpo CD30, considerado como expressão característica do linfoma anaplásico de grandes células (LAGC), entretanto também é expresso em outros linfomas de fenótipos T ou B e no LH (Filippa *et al.* 1996, Jaffe 2001, Vadakara *et al.* 2012). Portanto, para o diagnóstico correto, além das características histológicas e fenotipagem, deve-se também considerar os aspectos clínicos, sendo que alguns tipos são específicos para órgãos como baço e intestino (Swerdlow *et al.* 2008).

Para este trabalho foram estudados dois tipos de linfomas. O primeiro é o linfoma difuso de grandes células B (LDGCB) o qual se origina dos linfócitos B e se caracteriza por apresentar células de tamanho maior que os macrófagos ou mais do que duas vezes o tamanho dos linfócitos normais (Martelli M *et al.* 2013). O segundo é o LH, definida como uma neoplasia linfóide monoclonal derivada de linfócitos B, com origem na grande maioria dos casos nos linfonodos, e tem como característica patognomônica as células Hodgkin Reed-Sternberg (HRS) (Gobbi *et al.* 2013). Na cavidade bucal o linfoma mais comum é o LDGCB, já o LH primário ou como manifestação secundária da cavidade bucal é uma entidade extremamente rara (Darling *et al.* 2012). Na literatura há menos de 20 casos relatados de LH na cavidade bucal, no entanto, poucos desses casos apresentam uma descrição morfológica detalhada assim como uma análise de IQ amplo, o que permitiria a correta caracterização desses casos excluindo a possibilidade de outras neoplasias linfóides que apresentam células HRS-like.

Além disso, é importante analisar certas características do ambiente tumoral. Uma delas é a atividade angiogênica, a qual é fundamental para a progressão tumoral que envolve o crescimento, invasão e metástase tumoral (Folman *et al.* 1992). Assim, recentes evidências apontam que as propriedades angiogênicas das células neoplásicas e o microambiente vascular são altamente relevantes em vários subtipos de linfomas (Aggarwal *et al.* 2012). Deste modo, estudos mostram que LNH de alto grau quando comparado com lesões de baixo grau apresentam um aumento significativo no número de vasos o que indica que a angiogênese aumenta com a progressão do tumor (Arias *et al.* 2000). Além disso, os mastócitos como parte do microambiente tumoral têm sido correlacionados à angiogênese dos linfomas, conseqüentemente o aumento tanto dos mastócitos como do número de vasos está relacionado com maior grau de malignidade dos LNH (Ribatti *et al.* 2000). Por isso, estas informações levaram os pesquisadores a sugerir que os mastócitos podem contribuir, pelo menos em parte, com a angiogênese dos LNH de células B e dos LH.

Outra característica importante do micro ambiente tumoral é a presença de células dendríticas (CDs), consideradas as mais importantes das células apresentadoras de antígenos (APCs) (Ma et al. 2013). A infiltração das CDs tem sido associada a um prognóstico favorável em várias neoplasias malignas (Chang *et al.* 2007) . Assim, a redução do número de CDs em LNH e LH está correlacionada com a perda do controle tumoral, favorecendo o crescimento, infiltração e metastátese do tumor.

Diante disso, este estudo analisou comparativamente a expressão IQ e de HIS com o intuito de realizar o diagnóstico diferencial entre LDGCB, que apresentem células HRS-like da cavidade bucal, e casos de LH linfonodal. Adicionalmente foi realizada uma comparação de nossos resultados com os casos de LH da cavidade bucal relatados na literatura inglesa. Ao mesmo tempo, através de parâmetros morfométricos avaliados com marcadores IQs para células endoteliais e para mastócitos, analisou-se a angiogênese em LDGCB de boca e LH linfonodal. Finalmente, analisamos a identificação, densidade e distribuição das células dendríticas em LDGCB de boca e LH linfonodal.

REVISÃO DA LITERATURA

LINFOMA DIFUSO DE GRANDES CÉLULAS B

O linfoma difuso de grandes células B (LDGCB) é uma neoplasia maligna que se origina dos linfócitos B, apresentando células grandes, maiores que os macrófagos ou mais do que duas vezes o tamanho de linfócitos normais, mostrando padrão celular difuso (Swerdlow *et al.* 2008). O LDGCB pode ser subdividido em distintas entidades de acordo com sua morfologia, biologia e características clínicas, considerando-se além dos aspectos morfológicos, a localização e associação com vírus (Alizadeh *et al.* 2000, Rosenwald *et al.* 2002, Swerdlow *et al.* 2008, Gurbuxani *et al.* 2009). Os casos que não se enquadram nestas entidades propostas, são classificados como LDGCB, sem outra especificação (LDGCB-SOE) (Tabela 1).

Tabela 1 Variantes, subgrupos e subtipos de Linfomas de Grandes Células Tipo B, de acordo com a OMS (Swerdlow *et al.* 2008).

Linfoma Difuso de Grandes Células B, Sem Outra Especificação (SOE)	
Variantes morfológicas comuns	<ul style="list-style-type: none">• Centroblastico• Immunoblastico• Anaplásico
	Subgrupos moleculares
	<ul style="list-style-type: none">• Células B – like do centro germinativo• Células B – like ativadas
Variantes morfológicas raras	Subgrupos imunoistoquímicos
	<ul style="list-style-type: none">• CD5 positivo LDGCB• Células B – like do centro germinativo• Células B – like, não - centro germinativo.
Subtipos de Linfoma Difuso de Grandes Células B	
	<ul style="list-style-type: none">• Linfoma de grandes células B rico em células T/histiócitos• LDGCB primário do sistema nervoso central (SNC)• LDGCB primário cutâneo, “leg type” (tipo perna)• LDGCB do idoso EBV positivo
Outros Linfomas de Grandes Células B	

-
- Linfoma de grandes células B, primário mediastinal (tímico)
 - Linfoma de grandes células B, intravascular
 - LDGCB associado com inflamação crônica
 - Granulomatose linfomatóide
 - Linfoma de grandes células B ALK positivo
 - Linfoma plasmablástico
 - Linfoma de grandes células B originado na doença de Castleman variante multicêntrica associada a HHV8
 - Linfoma de efusão primária
-

Casos de LDGCB não classificáveis (“borderline”)

- Linfoma de células B, não classificável, com características intermediárias entre linfoma difuso de grandes células B e linfoma de Burkitt
 - Linfoma de células B, não classificável, com características intermediárias entre linfoma difuso de grandes células B e linfoma de Hodgkin clássico
-

O LDGCB representa aproximadamente 30% de todos os casos de LNH, com taxa de incidência de 7,1 a cada 100.000 pessoas, correspondendo a cerca de 25.000 casos novos a cada ano nos Estados Unidos (Howlader *et al.* 2009). Pode ocorrer em todos os grupos etários, no entanto, a maior prevalência é em idosos, com média de idade de 65 anos e discreta predileção pelo gênero masculino. Deve-se considerar que o linfoma de Burkitt (LB) e o LDGCB correspondem à maioria dos linfomas B da infância (Ogwang *et al.* 2011, Ferreira *et al.* 2012).

A etiologia do LDGCB é desconhecida. Geralmente apresenta-se como tumor primário, no entanto, pode surgir através da transformação ou progressão de um linfoma menos agressivo, como a leucemia linfocítica crônica / linfoma linfocítico de pequenas células (LLC/LLPC), linfoma folicular (LF), linfoma da zona marginal (LZM) ou linfoma de Hodgkin de predominância linfocítica nodular (LHPLN) (Tsimberidou *et al.* 2005, Swerdlow *et al.* 2008). Pacientes com imunodeficiência possuem risco mais elevado em desenvolver LDGCB, sendo que estes casos são comumente associados com infecção pelo vírus Epstein-Barr (VEB) (Park *et al.* 2007, Marques *et al.* 2012).

A maioria dos casos é nodal, no entanto, em 40% dos casos há envolvimento extranodal (Armitage *et al.* 1998, Swerdlow *et al.* 2008). O LDGCB é o mais comum em

quase todos os sítios extranodais, afetando preferencialmente o trato gastrointestinal (Swerdlow *et al.* 2008). Em pacientes com AIDS ou com outro tipo de imunossupressão, estes tumores podem ser extranodais em mais de 60% dos casos (Ioachim and Madeiros 2009, Chi *et al.* 2012). Os pacientes geralmente apresentam uma massa de crescimento rápido, em um único linfonodo ou extranodalmente (Armitage and Weisenburger 1998, Derenzini *et al.* 2012). Aproximadamente 30% dos casos apresentam os chamados sintomas “B”, que consistem em febre, sudorese noturna e perda de peso.

Morfologicamente, a arquitetura do linfonodo está desorganizada, porém é comum identificar alterações arquiteturais parciais, geralmente ao nível interfolicular e/ou sinusoidal, com distribuição das células malignas em agregados nodulares confluentes. Estes agregados nodulares neoplásicos diferem dos folículos linfóides normais por serem maiores e irregulares. Os folículos linfóides e os seios subcapsulares são substituídos por lençóis de células grandes neoplásicas (Ioachim and Madeiros 2009). O tecido perinodal é comumente afetado. Bandas finas ou largas de tecido esclerosado podem ser observadas, sendo que a esclerose se apresenta em tumores de evolução insidiosa, enquanto que necrose é observada em tumores de crescimento rápido (Dan 2010). Em alguns casos, as células neoplásicas estão dispersas e entremeadas com linfócitos, plasmócitos e macrófagos, estes últimos fagocitando detritos celulares (Pileri *et al.* 2000, Ioachim and Madeiros 2009). Em casos com predominância de células de tamanho médio, deve-se excluir possibilidades de manifestação leucêmica extramedular, LB ou linfoma de células do manto (LCM) do tipo blastoide (Swerdlow *et al.* 2008, Ioachim and Madeiros 2009, Dan 2010).

O LDGCB tem ampla variedade morfológica, geralmente mostrando pronunciado pleomorfismo, com presença de numerosos linfócitos T e histiócitos. Nos casos em que há células reativas, deve ser considerado o diagnóstico diferencial de linfoma de grandes células B rico em células T e histiócitos (LGCBRTH) (Swerdlow *et al.* 2008, Gurbuxani *et al.* 2009).

A primeira variante morfológica que consideraremos é a centroblastica, a mais comum e de melhor prognóstico (Gurbuxani *et al.* 2009, Jaffe *et al.* 2011). Esta variante é caracterizada por células de tamanho médio a grande, com núcleo vesicular ovóide ou arredondado, contendo 2 a 4 nucléolos periféricos, lembrando centroblastos. O citoplasma é

escasso podendo ser anofílico ou basofílico. Quando esta população celular corresponde a mais de 90%, é chamado de monomórfica, caso contrário é definida como polimórfica usualmente constituída por uma mistura de centroblastos e imunoblastos (Engelhard *et al.* 1997, de Leval *et al.* 2009).

A segunda variante morfológica é a imunoblástica, que apresenta células com núcleo central, fina membrana nuclear e nucléolo proeminente localizado centralmente. No diagnóstico diferencial deve ser considerado o linfoma plasmoblástico e plasmocitoma/mieloma múltiplo (Swerdlow *et al.* 2008, Jaffe and Pittaluga 2011).

E a terceira variante é a anaplásica, que se caracteriza por apresentar grandes células arredondadas, ovóides ou poligonais, com núcleo pleomórfico ou bizarro. No diagnóstico diferencial deve ser considerado LAGC e carcinoma indiferenciado (Haralambieva *et al.* 2000, Vadakara and Pro 2012).

Para confirmar o diagnóstico do LDGCB por citometria de fluxo (CF) são utilizados os marcadores CD19, CD20, CD22 e CD79a, enquanto que CD20, CD79a e PAX5 são comumente usados em IQ. Em alguns subtipos deste linfoma pode ocorrer ausência ou expressão fraca de um ou mais antígenos pan-B, e a perda da expressão de CD20 é comum após o uso de rituximab (Dan 2010). Para estes casos, outros marcadores tais como imunoglobulinas de cadeia leve ou pesada, CD22, CD79a, PAX5 e CD138 podem auxiliar no diagnóstico (Dong *et al.* 2008, Bodoor *et al.* 2012). O antígeno comum leucocitário (LCA ou CD45RB) está ausente em cerca de 30% das variantes imunoblástica e anaplásica do LDGCB (Falini *et al.* 1990, Higgins *et al.* 2008). Algumas imunoglobulinas como IgM, IgG e IgA podem ser expressas na superfície ou no citoplasma (Loddenkemper *et al.* 2004, Horna *et al.* 2011). A restrição de cadeia leve kappa ou lambda pode ser útil para confirmar a monoclonalidade, enquanto que CD30 pode apresentar positividade principalmente na variante anaplásica (Falini *et al.* 1990, Gurbuxani *et al.* 2009, Vadakara and Pro 2012). CD5 é expresso em até 10% dos casos (Yamaguchi *et al.* 2002, Hans *et al.* 2004, Higgins *et al.* 2008).

Outros anticorpos que têm sido usados com graus variáveis de expressão são CD10 reportado em 30% – 60% dos casos, BCL6 em 60 – 90% e o MUM1 em 35 – 65% dos casos (Muris *et al.* 2006, Amen *et al.* 2007, Bodoor *et al.* 2012). Alguns relatos apontam

que a expressão de BCL2 está associada com curso clínico mais agressivo (Alacacioglu *et al.* 2009, Iqbal *et al.* 2011). O índice de proliferação celular nos LDGCB avaliado com Ki-67 é alto, geralmente acima de 40%, chegando até 90% em alguns casos (Llanos *et al.* 2001, Yoon *et al.* 2010).

Várias translocações cromossômicas não aleatórias têm sido relatadas no LDGCB, envolvendo os genes BCL6 (35% - 40% dos casos), BCL2 (13% translocações, 24% ampliações), c-MYC (15%), FAS (20%) e TP53 (16%) (Visco *et al.* 2012). No entanto, estas alterações genéticas nem sempre estão associadas com a superexpressão dos produtos dos genes correspondentes (Kramer *et al.* 1998, Visco *et al.* 2012).

No diagnóstico diferencial do LDGCB deve-se considerar a mononucleose infecciosa, principalmente nos casos de LDGCB, variante imunoblástica. As células T predominam na mononucleose infecciosa, e determinação da restrição ou não de cadeia leve das imunoglobulinas, assim como a avaliação do rearranjo celular das imunoglobulinas podem ser necessários para diferenciar estas entidades. O LHPLN pode apresentar células grandes que lembram o LDGCB, no entanto um painel IQ adequado permite o diagnóstico correto. Outra entidade que deve ser diferenciada do LDGCB é o sarcoma granulocítico, caracterizado por ter grânulos intracitoplasmáticos positivos para cloroacetato esterase, lisozima, mieloperoxidase e CD68. O LF, grau 3, pode ser semelhante a variante centroblástica do LDGCB, entretanto o LF é positivo para BCL2 na maioria dos casos. Alguns casos podem lembrar LB, no entanto, no LDGCB as células são maiores e mais pleomórficas, enquanto que o LB tem padrão de céu estrelado, com alto grau de apoptose e mitose. Carcinomas indiferenciados podem ser morfológicamente similares ao LDGCB, mas a positividade para citoqueratina confirma o diagnóstico de carcinoma (Bianchini *et al.* 2003). Melanomas amelanóticos também podem simular um LDGCB, no entanto, a imunopositividade de S100 e HMB-45 em melanomas facilita o diagnóstico final. Como será mais detalhado abaixo, o LDGCB podem ter células grandes semelhantes às presentes nos LH clássicos.

O LDGCB é um linfoma de alto grau de agressividade que, com a terapia moderna é potencialmente curável (Coiffier 2007, Swerdlow *et al.* 2008). O curso clínico é variável, e embora a maioria dos pacientes responda inicialmente a quimioterapia, menos da metade

dos pacientes alcança remissão durável (Abramson *et al.* 2005). Pacientes com doença em estágio inicial, tratados com quimioterapia e radioterapia adjuvante podem ter períodos longos de sobrevida livre da doença (Ioachim and Madeiros 2009).

LINFOMA DE HODGKIN

O LH é uma neoplasia linfoide monoclonal derivada de linfócitos B em aproximadamente 98% dos casos, o restante 2% se origina dos linfócitos T (Marafioti *et al.* 2000, Seitz *et al.* 2000, Swerdlow *et al.* 2008, Kuppers *et al.* 2012).

Revisão Histórica e classificação

A história do LH começa com Thomas Hodgkin em 1832, quem descreveu a partir da história clínica e achados post-mortem, sete casos de uma doença caracterizada por linfadenopatia generalizada com envolvimento do baço e do mediastino (Hodgkin 1832, Tubiana 1996). Trinta anos mais tarde, Sir Samuel Wilks publica 15 casos, dos quais 13 semelhantes aos casos publicados por Thomas Hodgkin, utilizando o termo Doença de Hodgkin (DH) (Wilks 1865). Carl Sternberg (1889) e Dorothy Reed (1902) independentemente descreveram as células “diagnósticas”, chamadas posteriormente de células Reed-Sternberg (RS) (Pileri *et al.* 2002, Eberle *et al.* 2009).

Posteriormente na cidade de Rey, Nova Iorque (1965), surgiu uma nova classificação baseada na classificação de Lukes e Butler (1963):

1. Predomínio Linfocitário
2. Esclerose Nodular
3. Celularidade Mista
4. Depleção Linfocitária

Após o advento da IQ, os linfomas receberam nova classificação, proposta pelo *International Study Group* (Harris *et al.* 1994), modificando-se o nome de DH para LH, reconhecendo-se a origem linfocitária das células de Hodgkin/Reed-Sternberg (HRS). O LH foi dividido em duas entidades distintas, o LH clássico (LHC) e o linfoma de Hodgkin predominância linfocítica nodular (LHPLN). Por sua vez, o LHC foi subdividido em 4 subtipos histológicos:

1. Esclerose Nodular (EN)
2. Celularidade Mista (CM)
3. Depleção Linfocitária (DL)
4. Rico em Linfócitos (RL)

Esta proposta de classificação da REAL foi aceita pela OMS (Swerdlow *et al.* 2008).

Existem algumas características importantes a considerar do LH:

- A) A maioria dos casos se origina nos linfonodos, principalmente da região cervical.
- B) A maioria se apresenta em adultos jovens.
- C) O tecido neoplásico maligno corresponde a uma fração do tumor, formado usualmente por escasso número de células grandes mononucleadas ou multinucleadas, designadas como células HRS, permeadas por abundante infiltrado reativo misto.
- D) As células tumorais são frequentemente rodeadas por um “anel” de linfócitos T.

O LH apresenta dois picos de incidência, o primeiro entre 15 – 34 anos e o segundo após os 50 anos de idade. Envolve inicialmente a cadeia ganglionar da região cervical, espalhando-se para outros grupos de linfonodos adjacentes (Ioachim and Madeiros 2009). O LH representa aproximadamente 30% de todos os linfomas, sendo o gênero masculino ligeiramente mais atingido que o feminino (Swerdlow *et al.* 2008, Ioachim and Madeiros 2009, Gobbi *et al.* 2013).

A célula HRS é patognomônica do LH, no entanto representa apenas 1% do total da população celular, o restante é reativo. Este infiltrado reativo é formado por pequenos linfócitos, histiócitos, neutrófilos, eosinófilos, plasmócitos e fibroblastos em proporções variáveis, dependendo do subtipo histológico do LH (Mani *et al.* 2009). As células HRS têm origem a partir do centro germinativo ou de células imediatamente pós-centro germinativo (Kuppers *et al.* 1994, Marafioti *et al.* 2000, Tzankov *et al.* 2006).

Morfologicamente, a célula HRS é grande de 20 - 60 μm de diâmetro, citoplasma eosinofílico ou anfófilico, de tamanho variável. Os núcleos são grandes, com membranas evidentes e tipicamente simétricas, como “imagem em espelho”. Algumas células podem mostrar múltiplos núcleos, ou lóbulos nucleares interconectados, com amplo nucléolo

eosinofílico ou anofílico, lembrando inclusão nuclear (Pileri *et al.* 2002, Gobbi *et al.* 2013).

A variante anaplásica da célula HRS é altamente pleomórfica, geralmente encontrada no LHC-DL, mostrando núcleo bizarro com cromatina grosseira e hipercrômica, e nucléolos proeminentes. Nestes casos, no diagnóstico diferencial deve-se considerar o LAGC, carcinoma anaplásico e sarcomas (Eberle *et al.* 2009, Ioachim and Madeiros 2009).

O tratamento do LH é baseado principalmente no estadiamento clínico, usando-se o Sistema Ann Arbor modificado, mostrado a continuação.

Estadiamento Clínico Ann Arbor modificado:

- | | |
|-------------|---|
| Estádio I | Comprometimento de uma única cadeia linfonodal (I), o localizado em um único órgão ou de localização extra-linfática (I _E). |
| Estádio II | Comprometimento de duas ou mais cadeias linfonodais do mesmo lado do diafragma (II), ou localizado em um único órgão, ou ainda de localização extra-linfática com ou sem comprometimento de outras cadeias linfonodais do mesmo lado do diafragma (II _E). |
| Estádio III | Comprometimento de cadeias linfonodais em ambos os lados do diafragma (III), podendo também ser acompanhado pelo comprometimento localizado de um órgão ou localização extralinfática relacionada (III _E), ou comprometimento do baço (III _S), ou de ambos (III _{E+S}). |
| Estádio IV | Comprometimento difuso (multifocal) de um ou mais órgãos extralinfáticos, com ou sem comprometimento linfonodal associado; ou comprometimento isolado de um órgão extralinfático, com comprometimento linfonodal à distância (não regional). |

Cada estágio deve ainda ser dividido em A e B, de acordo com a ausência ou presença de sintomas.

A. Sem sintomas

B. Sintomas gerais:

1. Anorexia, fadiga, debilidade generalizada e perda inexplicável de mais de 10% do peso corporal habitual, nos seis meses anteriores ao primeiro atendimento.
2. Febre, com temperatura acima de 38°C por três dias consecutivos.
3. Sudorese noturna.

Considera-se que o subtipo histológico não é um indicador prognóstico importante. Com os tratamentos atuais, 70% - 80% dos casos mostram sobrevida em longo prazo. Em estágios iniciais do LH, a radioterapia tem sido usada como padrão por décadas, com excelentes índices de cura da doença. No entanto, devem-se considerar os possíveis efeitos colaterais decorrentes do tratamento. Em estágios intermediários, uma combinação de quimioterapia e radioterapia tem sido usada. Quando a doença encontra-se em estágio avançado ou apresenta recidiva, existem alternativas de tratamento, tais como, transplante autólogo de células-tronco, terapias específicas contra receptor alvo específico das células HRS e agentes que modulam o micro ambiente tumoral (Pileri *et al.* 2002, Banerjee *et al.* 2011, Diefenbach *et al.* 2013).

Linfoma de Hodgkin Clássico

O LHC representa 95% dos casos de LH, apresentando distribuição bimodal com relação à idade, predominando ligeiramente no gênero masculino (Ioachim and Madeiros 2009, Piccaluga *et al.* 2011). A celularidade é heterogênea, composta por uma minoria de células HRS, sendo que a maior parte corresponde a células reativas como linfócitos, eosinófilos, neutrófilos, histiócitos, plasmócitos e fibroblastos (Swerdlow *et al.* 2008, Piccaluga *et al.* 2011). Os nódulos linfáticos da região cervical são envolvidos em 75% dos casos, seguido pelos mediastinais, axilares e para-aórticos. O envolvimento primário extranodal é raro e discutível segundo alguns autores (Pileri *et al.* 2002, Asano *et al.* 2009, Dojcinov *et al.* 2010).

O anticorpo CD30 é um dos marcadores mais importantes para confirmação do diagnóstico do LHC, sendo positivo em mais de 98% das células HRS (Carbone *et al.* 1992, Chang *et al.* 1993, Kupperts *et al.* 2012), enquanto que o CD15 está expresso em

59%-93% dos casos (Higgins *et al.* 2008). Deve-se considerar que estes anticorpos não são específicos para as células HRS. A combinação da expressão CD30 e CD15, associado com a negatividade para LCA é típico da imunoexpressão das células HRS e suas variantes (Ioachim and Madeiros 2009, Gobbi *et al.* 2013). CD20 raramente é positivo para as células HRS, assim como CD79a (Schwering *et al.* 2003), enquanto que a expressão de PAX5/BSAP e MUM1 é comum (Foss *et al.* 1999, Marafioti *et al.* 2000, Torlakovic *et al.* 2002). Raramente alguns casos raros são positivos para marcadores de células T (Seitz *et al.* 2000, Tzankov *et al.* 2005). Muitas das células HRS encontram-se em proliferação, como demonstrado pela marcação com Ki-67 (Kanavaros *et al.* 2000, Kupperts *et al.* 2005).

As células HRS são positivas para o VEB em 20%-80% dos casos, na dependência do tipo histológico e das características epidemiológicas. Em pacientes HIV positivos, VEB (LPM1 e EBER1/2) está presente em 100% dos casos (Vassallo *et al.* 1993, Jarrett *et al.* 1999, Gulley *et al.* 2002, Piccaluga *et al.* 2011). As células HRS infectadas são negativas para EBNA-2 (Gulley *et al.* 2002).

No LHC são considerados quatro subtipos histológicos, esclerose nodular (LHC-EN), celularidade mista (LHC-CM), rico em linfócitos (LHC-RL) e depleção linfocitária (LHC-DL). Estes subtipos apresentam diferenças nas suas características clínicas, no padrão de crescimento, na presença de fibrose, na composição do infiltrado celular e na infecção pelo VEB. No entanto, esses subtipos apresentam o mesmo imunofenótipo das células tumorais (Swerdlow *et al.* 2008, Gobbi *et al.* 2013).

O prognóstico do LHC anteriormente às terapias modernas era pobre (Swerdlow *et al.* 2008), o mesmo ocorrendo em pacientes HIV positivos (Provencio *et al.* 2004, Allemani *et al.* 2006). Considera-se que o subtipo histológico não é indicador prognóstico importante. Assim, com os tratamentos atuais, 80%-90% dos casos mostram sobrevida em longo prazo. Em estágios iniciais do linfoma, a radioterapia tem sido usada por décadas, com excelentes índices de cura da doença (Pileri *et al.* 2002). Quimioterapia com adriamicina (doxorubicina), bleomicina, vimblastina e dacarbazina (ABVD) seguido pela irradiação do campo envolvido, é o tratamento com melhores resultados para o tratamento de pacientes com LH em diferentes estágios (Gobbi *et al.* 2013).

Linfoma de Hodgkin Clássico, Esclerose Nodular (LHC-EN)

O LHC-EN é o mais frequente, representando aproximadamente 70%-80% de todos os casos de LH, no entanto, a incidência pode variar de acordo com a região geográfica (Swerdlow *et al.* 2008, Ioachim and Madeiros 2009, Kuppers *et al.* 2012). Este subtipo mostra incidência similar entre os gêneros, ocorrendo comumente entre os 15-34 anos de idade (Au *et al.* 2004, Morton *et al.* 2006, Gobbi *et al.* 2013), mais frequentemente nos linfonodos da região cervical e do mediastino quando comparado com as outras variantes, o LHC-EN tem probabilidade maior de se espalhar por continuidade nas cadeias ganglionares. Morfologicamente as características mais relevantes deste subtipo são a esclerose do tecido conjuntivo, a presença de células do tipo lacunar e o padrão nodular do tumor (Pileri *et al.* 2002, Swerdlow *et al.* 2008, Ioachim and Madeiros 2009). A fibrose é evidente, formando a partir da cápsula do linfonodo bandas largas de colágeno, que subdividem o parênquima linfoide em nódulos de grandes dimensões, geralmente visíveis no exame macroscópico. A fibrose é menos evidente nos outros subtipos (Pileri *et al.* 2002).

As células HRS do tipo lacunar são uma característica do LHC-EN, mostrando pleomorfismo significativo, podendo ter núcleo uni ou multilobular, e nucléolos grandes e evidentes (Piccaluga *et al.* 2011). Algumas variações morfológicas do LHC-EN foram descritas, como a chamada fase celular da esclerose nodular, reconhecida pela presença de células lacunares, com tendência evidente para formação de nódulos, mas sem a deposição de bandas de colágeno. A variante sincicial é caracterizada por grandes agregados de células neoplásicas que podem conter focos necróticos, encontrada em até 88% dos casos e associada com comportamento clínico agressivo (Ben-Yehuda-Salz *et al.* 1990, Eberle *et al.* 2009).

Diferenciar LHC-EN e LAGC não é simples em alguns casos (Pileri *et al.* 1994, Pileri *et al.* 1995, Piccaluga *et al.* 2011). Em casos difíceis, a positividade para CD15 e marcadores de fenótipo B, juntamente com a ausência do rearranjo dos genes TCR e ALK favorecem o diagnóstico de LHC (Pileri *et al.* 2002). Outra neoplasia a ser considerada no diagnóstico diferencial é o linfoma de grandes células B primário mediastinal (LGCBPM), que representa 2,4% dos linfomas malignos, afetando principalmente mulheres jovens

(Harris *et al.* 2000, Quintanilla-Martinez *et al.* 2011). Achados histológicos como padrão nodular, esclerose, células T reativas, eosinófilos, células semelhantes às células HRS, juntamente com a expressão positiva frequente para CD30 podem simular LHC (Pileri *et al.* 2002, Zhao 2009). No entanto, as células neoplásicas do LGCBPM regularmente expressam CD19, CD20, CD22, CD79a, e cerca de 75% dos casos expressam a proteína do gene MAL (Copie-Bergman *et al.* 1999, Quintanilla-Martinez and Fend 2011).

O LHC-EN tem melhor prognóstico quando comparado com os outros subtipos de LHC (Allemani *et al.* 2006, Ioachim and Madeiros 2009).

Linfoma de Hodgkin Clássico, Celularidade Mista (LHC-CM)

LHC-CM tem como característica principal o crescimento difuso, com frequente localização paracortical. As células HRS são numerosas e de fácil visualização. A composição do infiltrado inflamatório reativo deste subtipo é caracterizada pela presença de plasmócitos, histiócitos epitelióides, eosinófilos, e células T que formam rosetas em torno das células neoplásicas. Devido ao infiltrado reativo variado, este subtipo de LHC recebeu o nome de CM (Pileri *et al.* 2002, Kuppers *et al.* 2012). Este é o segundo subtipo mais comum do LHC, representando 15%-25% dos casos, sendo comum em pacientes HIV positivos. Ocorre em pacientes com média de idade de 38 anos, com predileção pelo gênero masculino (Shimabukuro-Vornhagen *et al.* 2005, Swerdlow *et al.* 2008). No LHC-CM, os linfonodos periféricos são os mais acometidos, e com menor frequência, a região do mediastino, baço, medula óssea e fígado. É rara a disseminação linfonodal nesta variante, mas, quando ocorre se apresenta de forma linfonodal não contínua. Os pacientes com LHC-CM frequentemente manifestam sintomas B (Pileri *et al.* 2002).

Têm sido relatadas duas variantes morfológicas de LHC-CM, a interfolicular e a rica em células epitelióides. A variante interfolicular provavelmente representa um envolvimento parcial do linfonodo pelo LH, porém, é raramente observada. Esta variante se caracteriza pela presença de numerosas células HRS ao redor de folículos linfóides reativos (Piccaluga *et al.* 2011). Esta rara variante deve ser tomada em consideração, para evitar a possível confusão com hiperplasia folicular ou com a doença de Castleman (Basu *et al.* 2006, Vasudev Rao *et al.* 2007). A variante rica em células epitelióides é relativamente

comum, apresentando uma reação de células epitelióides com formação proeminente de granulomas. Esta variante deve ser diferenciada do linfoma de Lennert (linfoepitelióide), visto que o tratamento é diferente (Summers *et al.* 2009). Alguns casos diagnosticados no passado como DH atípica correspondem a linfomas de células T periféricos com grande quantidade de células epitelióides (Pileri *et al.* 2002). Existem alguns elementos importantes para o reconhecimento de linfoma de Lennert, como alto pleomorfismo nuclear do componente linfoide, em contraste com a morfologia nuclear dos linfócitos reativos do LH (Butler 1992); o perfil IQ da população celular atípica é CD3+, CD45+, ocasionalmente CD30+ e CD15- (Falini *et al.* 1990, Pileri *et al.* 1998, Savage *et al.* 2011); além do alto índice mitótico (Osborne *et al.* 1990).

O LHC-CM tem como principais diagnósticos diferenciais, além do linfoma de Lennert, o LGCBRTH (Pileri *et al.* 2002). O linfoma de Lennert é um tipo de linfoma periférico de células T, SOE, com grande quantidade de células epitelióides e algumas células blásticas, que podem lembrar células HRS. O LGCBRTH foi descrito pela primeira vez por Ramsay *et al.* em 1988. É um subtipo de LDGCB agressivo, geralmente diagnosticado em estágios avançados da doença, com esplenomegalia, envolvimento da medula óssea e linfadenopatia mesentérica, achados raros no LH (Venizelos *et al.* 2008). A morfologia e padrão de crescimento celular, assim como o perfil IQ, ajudam a diferenciar esta entidade do LH (Nguyen *et al.* 1996, Rudiger *et al.* 1998, Fraga *et al.* 2002).

Antes da evolução das modalidades terapêuticas, o LHC-CM era considerado de pior prognóstico quando comparado com o LHC-EN, entretanto atualmente o prognóstico é favorável (Allemani *et al.* 2006, Mani and Jaffe 2009).

Linfoma de Hodgkin Clássico, Rico em linfócitos (LHC-RL)

O LHC-RL é caracterizado pelo escasso número de células HRS, com um fundo celular em que predominam linfócitos maduros pequenos, com escassos neutrófilos e eosinófilos. O padrão de crescimento pode ser nodular ou difuso, sendo que no nodular frequentemente podem ser observados centros germinativos residuais (Ashton-Key *et al.* 1995, Kuppers *et al.* 2012).

O LHC-RL representa 3%-6% de todos os casos de LHC, com 70% dos casos ocorrendo no gênero masculino. Os linfonodos periféricos são os mais afetados, com menor envolvimento da região mediastinal, e os sintomas B são pouco frequentes (Anagnostopoulos *et al.* 2000, Shimabukuro-Vornhagen *et al.* 2005). Morfologicamente, pode ser confundido com LHPLN, no entanto, a distinção entre LHC-RL e LHPLN é sempre possível através da análise IQ, identificando as células HRS (Anagnostopoulos *et al.* 2000, Shimabukuro-Vornhagen *et al.* 2005, Nam-Cha *et al.* 2009). O prognóstico do LHC-RL é considerado ligeiramente melhor que os outros subtipos de LHC (Shimabukuro-Vornhagen *et al.* 2005, Diehl *et al.* 2007, Ioachim and Madeiros 2009, Boll *et al.* 2013).

Linfoma de Hodgkin Clássico, Depleção Linfocitária (LHC-DL)

O LHC-DL caracteriza-se pela escassez ou ausência do componente linfoide, relativa predominância de células HRS e com grau de fibrose variável. É o mais raro dos quatro subtipos, representando menos de 1% de todos os casos do LHC (Swerdlow *et al.* 2008, Gobbi *et al.* 2013). Há predileção pelo gênero masculino (60%-75%), e apresenta-se principalmente entre os 30-37 anos de idade (Kuppers *et al.* 2012). O LHC-DL tem predileção pelos linfonodos retroperitoneais, órgãos abdominais e medula óssea. Como no LHC-CM, esta variante geralmente é restrita a um único local ou região, e quando apresenta disseminação geralmente é linfonodal não contínua. O LHC-DL na maioria das vezes é diagnosticado nos estágios III e IV da doença, apresentando em até 50% dos casos sintomas B e envolvimento da medula óssea, sendo considerado o subtipo mais agressivo do LHC. Têm sido relatados dois padrões, o fibroso e o reticular/sarcomatoso (Pileri *et al.* 2002, Swerdlow *et al.* 2008, Eberle *et al.* 2009, Piccaluga *et al.* 2011). A escassez do componente linfoide, a reação fibrótica variável e a relativa abundância de células HRS são características importantes no exame microscópico (Pileri *et al.* 2002, Mani and Jaffe 2009). O padrão fibrótico do LHC-DL caracteriza-se por um apagamento completo da arquitetura linfonodal, e às vezes a cápsula do linfonodo está preservada.

Em pequeno aumento, o quadro histopatológico pode ser semelhante à linfadenopatia em fase de depleção linfocitária, observada nos casos de pacientes HIV positivos, sendo necessária avaliação cuidadosa para estabelecimento do diagnóstico correto (Pelstring *et al.* 1991, Butler 1992, Said 2007, Ruiz *et al.* 2012). O padrão sarcomatoso do LHC-DL é

caracterizado pela grande quantidade de células HRS, sendo que algumas podem ser do tipo mumificado. O crescimento neoplásico causa apagamento difuso da arquitetura linfonodal, com escasso número de células reativas, no entanto, focos de necrose são usualmente encontrados (Pileri *et al.* 2002).

O diagnóstico diferencial do LHC-DL inclui o fibrossarcoma inflamatório (Mirra *et al.* 1996), histiocitose de células de Langerhans, sarcoma pleomórfico indiferenciado e carcinoma nasofaríngeo. Nestes casos, a imunofenotipagem é essencial para o diagnóstico correto (Pileri *et al.* 2002, Kuppers *et al.* 2012).

Linfoma de Hodgkin, predominância linfocítica nodular (LHPLN)

O LHPLN é uma neoplasia de células B monoclonal, que se caracteriza por apresentar padrão nodular, com ou sem áreas difusas, contendo células neoplásicas conhecidas como LP, variante da célula HRS, e que antigamente eram chamadas de células L&H (Swerdlow *et al.* 2008, Ioachim and Madeiros 2009, Shankar *et al.* 2012). Este tipo de LH difere do tipo clássico na morfologia, fenótipo, genótipo e comportamento clínico (Smith 2010). O LHPLN representa 4%-5% de todos os casos de LH (Shankar and Daw 2012), predominando em homens, principalmente na faixa etária entre os 30-50 anos de idade. Afeta mais comumente a região cervical, seguida da axilar e linfonodos inguinais, raramente ocorre nas regiões mediastinal, esplênica e medula óssea (Fan *et al.* 2003, Nogova *et al.* 2006). Clinicamente se comporta como um linfoma de células B de baixo grau, sendo que muitos pacientes apresentam linfadenopatia periférica localizada (Mason *et al.* 1994, Tsai *et al.* 2007, Lee *et al.* 2009). Em menos de 10% dos pacientes ocorrem os sintomas B (Tsai and Mauch 2007, Smith 2010). Aproximadamente 5%-25% dos pacientes mostram doença avançada, com envolvimento de múltiplos grupos de linfonodos, fígado, baço, osso e /ou medula óssea (Ioachim and Madeiros 2009, Shankar and Daw 2012).

Macroscopicamente, o linfonodo pode ter aparência tipicamente nodular, consistência firme e coloração pálida (Biasoli *et al.* 2010). Histologicamente, a arquitetura linfonodal pode ser substituída de maneira total ou parcial por infiltrado nodular (comum) ou difuso (raro), ou pode apresentar-se numa combinação nodular e difusa. Os nódulos podem variar de tamanho, mas geralmente são maiores do que folículos linfoides reativos e raramente

apresentam centros germinativos, podendo estar justapostos (Fan *et al.* 2003, Smith 2010). A célula LP que caracteriza o LHPLN representa menos de 1% do total da população celular, sendo grande, núcleo proeminente e escasso citoplasma. Os núcleos estão dobrados/contorcidos, lembrando grãos de pipoca, sendo chamadas de células “popcorn”. Os nucléolos são geralmente múltiplos, basofílicos e menores dos observados nas células HRS. No entanto, algumas células LP podem apresentar nucléolo proeminente e/ou apresentar mais de um núcleo, fazendo-as praticamente indistinguíveis das células HRS na análise puramente morfológica. Áreas de esclerose podem ser observadas em 7% dos casos, e em até 44% de lesões antigas ou recorrentes (Swerdlow *et al.* 2008, Biasoli *et al.* 2010, Smith 2010).

As células LP apresentam positividade para CD20, CD19, CD22, CD79a, BCL6, e CD45 em quase todos os casos. A cadeia J está presente na maioria dos casos (Greiner *et al.* 1996, Fan *et al.* 2003, Lee and LaCasce 2009). EMA e MUM1 são expressas em 40% a 50% dos casos (Anagnostopoulos *et al.* 2000, Boudova *et al.* 2003). Diferentemente das células HRS do LHC, marcadores como OCT-2 e BOB.1 são frequentemente co-expressados nos casos de LHPLN (Torlakovic *et al.* 2001, Uherova *et al.* 2003, Shankar and Daw 2012). As células LP parecem ter origem no centro germinativo, conforme mostra a positividade para CD40, CD80 e CD86, moléculas envolvidas na apresentação antigênica (Re *et al.* 2005, Smith 2010).

Uma diferença fundamental entre o LHPLN e o LHC é a negatividade para CD30 e CD15 das células LP em quase todos os casos (Smith 2010). Uma característica importante do LHPLN é a marcação com CD3 e CD57 dos linfócitos T que formam um anel ao redor das células LP. Além das células T, os linfócitos B também fazem parte do infiltrado reativo no LHPLN, formando agregados nodulares (Fan *et al.* 2003). EBV está geralmente ausente nas células LP, em contraste com as células HRS do LHC. No entanto, linfócitos reativos no LHPLN podem eventualmente serem positivos para EBV (Delsol *et al.* 1992, Niedobitek *et al.* 1997, Hjalgrim 2012).

A Transformação Progressiva do Centro Germinativo (TPCG) é uma lesão reativa comum em crianças, que pode estar presente no mesmo linfonodo com LHPLN. Assim, a revisão de cortes seriados é recomendada para excluir malignidade em casos de linfonodos

hiperplásicos que apresentem áreas de TPCG. Em pequeno aumento, os folículos com transformação progressiva são similares aos nódulos observados no LHPLN, formados por células do manto não neoplásicas (Smith 2010). Já em maior aumento, não se identificam as células LP, características do LHPLN. O painel IQ não identifica as rosetas de linfócitos T, característicos no LHPLN (Krishnan *et al.* 2010). O LHPLN pode lembrar também o LF. Algumas vezes os folículos neoplásicos no LF podem estar infiltrados por células do manto dando aparência floral (Good *et al.* 2009). Nos casos de LF, as células neoplásicas são positivas para CD10, CD20, BCL6 e BCL2 (Smith 2010).

Outra entidade que deve considerar-se no diagnóstico diferencial é o LGCBRTH. Este linfoma é um LNH agressivo, mais comum em homens, diagnosticado comumente em estágios avançados, quando o paciente apresenta frequentemente sintomatologia sistêmica. Como o prognóstico e tratamento destes linfomas são diferentes, a correta classificação é essencial (Smith 2010). A falta de células T formando um anel envolvendo as células neoplásicas, assim como a falta da rede estromal de células dendríticas foliculares favorece o diagnóstico de LGCBRTH (Boudova *et al.* 2003, Swerdlow *et al.* 2008).

O desenvolvimento do LHPLN é lento e responde bem ao tratamento, embora a recidivas aconteçam frequentemente. Os pacientes com estágios iniciais da doença apresentam sobrevida de 10 anos em mais de 80% dos casos. A doença raramente é fatal, sendo que muitos pacientes morrem por complicações relacionadas com o tratamento (Biasoli *et al.* 2010). No entanto casos com envolvimento da medula óssea mostram comportamento agressivo (Khoury *et al.* 2004). Quando os pacientes apresentam doença localizada, sugere-se tratamento com radioterapia (Hall *et al.* 2007). Os casos com doença multifocal são tratados com quimioterapia, incluindo Doxorrubicina (Adriamicina) ou a combinação de Doxorrubicina, Bleomicina, Vinblastina e Dacarbazina (ABVD) (Diehl *et al.* 1999, Nogova *et al.* 2006, Shankar and Daw 2012).

LHC primário extranodal é raro e representa menos de 1% de todos os casos, tem sido relatado como o sítio mais comum de acometimento ao intestino delgado seguido por pulmão, tireóide, pele, sistema geniturinário e sistema nervoso central (Guermazi *et al.* 2001, Pranteda *et al.* 2010, Bautista-Quach *et al.* 2012). A manifestação primária ou secundária do LHC na cavidade bucal é extremamente rara, porém a manifestação

secundária na cavidade bucal é mais comum do que a lesão primária. Na literatura, há menos de 20 casos relatados de LHC na cavidade bucal. Poucos destes casos apresentam uma descrição morfológica detalhada, assim como um análise IQ amplo o que permitiria a correta caracterização destes casos excluindo a possibilidade de outras neoplasias linfoides que apresentam células HRS-like com positividade para CD30 e/ou CD15 assim como VEB (Darling *et al.* 2012).

Linfomas de células B, não classificável, com características intermediárias entre linfoma difuso de grandes células B e linfoma de Hodgkin clássico (LCB-NC-LDGCB/LHC)

Na classificação da OMS foram consideradas duas entidades de diagnóstico difícil e com características intermediárias entre dois tipos de linfomas, sendo uma delas o LCB-NC-LDGCB/LHC (Swerdlow *et al.* 2008, Ioachim and Madeiros 2009). São linfomas de linhagem B, apresentando sobreposição das características clínicas, morfológicas e/ou IQs, entre o LHC (principalmente o subtipo histológico EN) e o LDGCB primário do mediastino (LDGCB-PM) (Swerdlow *et al.* 2008). Anteriormente estes linfomas foram designados como “linfomas da zona cinzenta” (Gonzalez *et al.* 1991, Garcia *et al.* 2005, Traverse-Glehen *et al.* 2005, Quintanilla-Martinez and Fend 2011).

O LCB-NC-LDGCB/LHC ocorre em pacientes com idade entre 20 e 40 anos, predominando no gênero masculino, mostrando curso agressivo (Oschlies *et al.* 2011). A etiologia é desconhecida, no entanto, aproximadamente 10% dos casos mostram positividade para o VEB (Swerdlow *et al.* 2008). O local mais comumente atingido é o mediastino anterior, com variável envolvimento dos linfonodos supraclaviculares (Garcia *et al.* 2005, Traverse-Glehen *et al.* 2005).

Histopatologicamente, mostra infiltrado de células grandes atípicas, formando lençóis coesivos, lembrando as células HRS, com morfologia clássica, lacunar ou mumificada (Hoeller *et al.* 2012). Estas células neoplásicas encontram-se entremeadas por uma mistura de células inflamatórias incluindo linfócitos, plasmócitos, eosinófilos, histiócitos e granulócitos. Algumas áreas lembram LHC, enquanto outras parecem o LDGCB. Áreas de necrose são comuns, diferente do LHC estas áreas não apresentam infiltrado neutrofílico (Garcia *et al.* 2005, Carbone *et al.* 2010). Além da semelhança morfológica, as células

neoplásicas deste linfoma mostram sobreposição imunofenotípica entre o LHC e o LDGCB. Assim, a maioria dos casos mostram positividade para CD30, CD15, CD45, CD19, CD20, CD79a, incluindo os fatores de transcrição PAX5, OCT-2 e BOB.1 (Tzankov *et al.* 2003, Hoeller *et al.* 2010, Hoeller and Copie-Bergman 2012). A expressão da proteína MAL (Myelin and Lymphocyte), positiva em 70% dos casos de LDGCB-PM e em 10% dos casos de LHC, também apresenta positividade em proporção variável nos casos de LCB-NC-LDGCB/LHC. A proteína ALK é geralmente negativa. O infiltrado inflamatório é formado por células T, como no LHC (Carbone *et al.* 2010, Eberle *et al.* 2011, Jaffe and Pittaluga 2011).

Para distinguir um LHC de um LDGCB-PM, várias características podem ser consideradas: 1) no LHC a fibrose é usualmente em forma de banda e se distribui em torno dos agregados de células neoplásicas, enquanto que a fibrose nos casos de LDGCB-PM adquire uma forma de “malha”; 2) CD45 e CD79a são negativas no LHC e positivos no LDGCB-PM; 3) a expressão de PAX5 é fraca nas células HRS do LHC contrastando com a forte marcação nas células neoplásicas do LDGCB-PM; 4) CD15 é geralmente negativo no LDGCB-PM (Garcia *et al.* 2005, Zhao 2009).

Existem alguns pontos importantes para o diagnóstico de LCB-NC-LDGCB/LH. Deve ser semelhante morfológicamente ao LDGCB-PM, mas com forte expressão de CD15 e/ou ausência de positividade para VEB (Swerdlow *et al.* 2008). Casos ricos em células HRS-like lembram o LHC, mas são fortemente positivas para CD20 e/ou outros marcadores para células B (Hasserjian *et al.* 2009). Em resumo, quando as grandes células neoplásicas são negativas para CD45, o diagnóstico favorece um LHC, e quando expressam CD45 e CD79a, com negatividade para CD15, o diagnóstico favorece um linfoma de grandes células. Quando as células do linfoma expressam CD15, CD30, CD20, CD45, CD79a, PAX5 e/ou MAL, significa que estamos diante de um “linfoma da zona cinzenta” (Zhao 2009, Eberle and Jaffe 2011).

O curso clínico agressivo e o prognóstico desfavorável são características deste linfoma, diferente dos casos de LHC e LDGCB-PM. O tratamento destes linfomas não está bem definido e alguns centros propõem um tratamento como é feito nos casos de linfoma de grandes células B agressivo (Traverse-Glehen *et al.* 2005), enquanto que outros indicam o

regime normalmente usado nos casos de LHC (Cazals-Hatem *et al.* 2001, Oschlies *et al.* 2011).

ANGIOGÊNESE

A angiogênese é a formação de novos vasos sanguíneos a partir de uma vasculatura pré-existente, processo considerado fundamental para o crescimento tumoral (Poon *et al.* 2001). Um dos mais importantes mediadores da angiogênese é o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), sendo que os membros da família VEGF, que inclui VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, e o fator de crescimento placentário (PIGF), através de interações com seus receptores VEGFR-1, VEGFR-2 e VEGFR-3 regulam vários aspectos da angiogênese vascular e linfangiogênese. O VEGF-A (VEGF) é produzido por uma variedade de células tumorais, bem como por células do estroma tumoral, que se ligando aos receptores VEGFR-1 e VEGFR-2, transmitem os sinais mitogênicos primários do VEGF nas células endoteliais. VEGFR-1 também é expresso em células hematopoiéticas, mediando à quimiotaxia de monócitos, hematopoiese e o recrutamento de células progenitoras endoteliais (Ferrara *et al.* 2003). Crescimento e maturação de novos vasos são processos altamente complexos e coordenados, requerendo participação organizada das células endoteliais e células acessórias perivasculares em resposta a sinais pro-angiogênicos. A angiogênese também é importante em doenças hematológicas malignas, tanto de origem mielóide quanto linfoide (Weidner 1995, Mangi *et al.* 2000, Koster *et al.* 2005).

A densidade microvascular (DMV) é parâmetro importante para mensurar angiogênese, que pode ser determinada com auxílio de marcadores IQs para células endoteliais como vWF, CD31 e CD34 (Koster and Raemaekers 2005). Alguns estudos mostraram que nos linfomas a DMV está aumentada, quando comparados com gânglios linfáticos reativos, assim como é mais desenvolvida em linfomas agressivos do que em linfomas de baixo grau (Vacca *et al.* 1999, Koster and Raemaekers 2005). No LH há poucos estudos analisando a angiogênese, mas foi descrita a expressão do VEGF pelas células HRS (Doussis-Anagnostopoulou *et al.* 2002). A angiogênese dos linfomas também foi associada à presença de mastócitos, pois tem sido mostrado que estes são fonte de

fatores angiogênicos (Molin *et al.* 2002). A presença de mastócitos em grande variedade de tumores humanos é bem documentada (Ribatti *et al.* 2004), em linfomas sugere-se que os mastócitos podem contribuir a angiogênese em LNH-B (Ribatti *et al.* 2000, Duse *et al.* 2011). Mais recentemente, o VEGF tem sido detectado em células tumorais associadas com mastócitos, e juntamente com outras substâncias ativas secretadas pelos mastócitos, o VEGF poderia estimular a angiogênese e, conseqüentemente a progressão do tumor (Nechushtan 2010, Duse *et al.* 2011).

CÉLULAS DENDRÍTICAS (CDs)

As CDs são células apresentadoras de antígenos (APCs), com participações importantes na defesa do hospedeiro e envolvidas na resposta imune antitumoral (Cella *et al.* 1997, Hussin *et al.* 2009). As CDs são derivadas da medula óssea e são as responsáveis de iniciar a resposta imune primária (Ardavin 2003). Em estado imaturo, as CDs encontram-se distribuídas amplamente em vários tecidos, como epiderme, derme, baço, linfonodos, timo, fígado e sangue, possuindo capacidade de endocitose (Cella *et al.* 1997, Banchereau *et al.* 1998).

Nos diferentes locais anatômicos, as CDs apresentam variações fenotípicas, sendo que suas linhagens de origem, estádios de maturação e diferenças funcionais ainda não estão claramente estabelecidas. A função dos subtipos humanos de CDs é variada, e ressaltaremos o papel destas células na regulação da proliferação de células B e na diferenciação das células Th tipos 1 e 2 (Cella *et al.* 1997, Banchereau *et al.* 2000). A infiltração dos tumores por CDs é considerado um mecanismo imunológico de defesa, com potencial de eliminar células neoplásicas. Isto pode explicar os esporádicos relatos de remissões espontâneas observado em casos de carcinoma de células renais e melanoma (Bell *et al.* 1999, Palucka *et al.* 1999, Timmerman *et al.* 1999, Banchereau *et al.* 2000, Gunzer *et al.* 2001). A presença de CDs tem sido relatada como fator prognóstico favorável para vários tumores malignos (Iwamoto *et al.* 2003). Em linfomas da cavidade oral apenas um estudo foi realizado considerando-se as CDs, e concluiu-se que o microambiente tumoral e inter-relações celulares contribuem para a presença dos diversos tipos de CDs (Mesquita *et al.* 2009). Atualmente estudos clínicos com vacinas de CDs

demonstraram resposta eficaz de células T contra antígenos tumorais em linfomas e, em alguns casos os resultados clínicos são prometedores (Davison 2010).

MARCADORES IMUNOISTOQUÍMICOS

CD30 (Ber-H2)

O gene que codifica a molécula CD30 está localizado no cromossomo 1p36, fazendo parte da superfamília do fator de necrose tumoral (TNF), sendo considerado um marcador de ativação. O alvo reconhecido pelo anticorpo anti-CD30 é uma glicoproteína de 120 kDa, expressa por células linfoides, que após ativação apresenta três domínios diferentes, intracitoplasmático, transmembrana e extracelular. Na análise IQ, tanto em tecido fresco quanto em parafina, este anticorpo mostra padrões de positividade de membrana, em “dot” e difuso. Os primeiros dois padrões são característicos de células linfoides, com exceção do carcinoma embrionário que pode também apresentar estes padrões de marcação. O padrão difuso pode ser observado numa variedade de tumores malignos além dos linfomas, incluindo carcinoma pancreático, carcinoma nasofaríngeo e melanoma. O CD30 é expresso pelas células HRS, sendo um dos marcadores mais importantes para o diagnóstico do LHC. Também é usado para o diagnóstico do LAGC (Falini *et al.* 1995, Pileri *et al.* 2002).

CD15 (Leu-M1, Carb-3)

Leu-M1 foi relatado pela primeira vez em células mielomonocíticas, como um trissacarídeo fucosil-N-acetilactosamina de membrana, sendo que o epítipo também é conhecido como Lewis-X ou Hapteno-X (Arber *et al.* 1993). CD15 é expresso em granulócitos maduros, a marcação é variável em promielócitos, sendo negativo em mieloblastos. As células HRS do LHC são positivas em mais de 80% dos casos, apresentando principalmente marcação de membrana, no entanto pode ser observada expressão focal em “dot” associada ao complexo de Golgi (Pileri *et al.* 2002). A célula LP, característica do LHPLN, é negativa para CD15 (Venkataraman *et al.* 2011). Os LNH de fenótipos B e T expressam CD15 em aproximadamente 13% dos casos (Gorczyca *et al.* 2003). O sarcoma granulocítico é positivo para CD15 positivo em até 65% dos casos.

Alguns carcinomas podem ser positivos para CD15, como adenocarcinomas, carcinoma espinocelular e carcinomas indiferenciados (Arber and Weiss 1993).

CD20 (L26)

CD20 é uma proteína transmembrana de 35 kDa envolvida na ativação de células B. É expressa no início da diferenciação das células B, perdendo esta expressão no estágio final de diferenciação, como nos plasmócitos. O padrão de marcação é de membrana. Em tecidos normais, os linfócitos do centro germinativo, da zona do manto e interfoliculares são positivos para CD20, exceto os plasmócitos. Em tecidos neoplásicos, a maioria dos LNH de células B maduras são CD20 positivos, mas é raramente expresso no linfoma linfoblástico de fenótipo B, uma neoplasia de células B precursoras. As células LP do LHPLN são positivas para CD20, enquanto isto raramente ocorre nas células HRS do LHC (Rassidakis *et al.* 2002, Tzankov *et al.* 2003, Tzankov *et al.* 2003).

CD3

O CD3 é um complexo proteico formado por quatro moléculas diferentes ($\gamma, \delta, \epsilon, \zeta$) as quais se associam com o receptor de células T (TCR), levando à ativação dos linfócitos T (Campana *et al.* 1987). Este anticorpo é expresso pelas células T no timo, medula óssea, sangue periférico e tecido linfoide. CD3 é um dos primeiros antígenos detectáveis nos linfócitos T imaturos no timo, com expressão limitada ao citoplasma, mudando para membrana quando a célula T é madura. Além das células T, as células de Purkinje do cerebelo também são positivas para CD3. A maioria das neoplasias de origem T e/ou NK é positiva para CD3 (Higgins *et al.* 2008).

CD79a (JCB117)

CD79a é um heterodímero transmembrana, com peso molecular de 82-95 kDa. Pertence à superfamília das imunoglobulinas, a qual abrange duas glicoproteínas transmembrana, CD79 α (a), com massa molecular de 40-45 kDa, e CD79 β (b), com massa molecular de 37 kDa. A expressão de CD79a é em grande parte restrita a linhagem de células B. Em células B precursoras, as cadeias da proteína CD79 já estão expressas no citoplasma. A expressão

de superfície de CD79 começa no estágio de células pró-B e persiste durante toda a diferenciação de células B. CD79a é mais fortemente expresso por células B na zona do manto do que pelas células B do centro germinativo. Mais de 97% dos linfomas de células B são positivos para CD79a, sendo que esta positividade pode persistir após terapia com anti-CD20, que torna o anticorpo CD20 negativo (Chu *et al.* 2001). Neoplasias precursoras de células B podem ser positivas para CD79a, sendo importante para o diagnóstico visto que outros marcadores de células B são geralmente negativos. As células LP do LHPLN são positivas para CD79a (Korkolopoulou *et al.* 1994, Chu and Arber 2001).

CD43

CD43 é uma proteína transmembrana, associada com funções imunológicas de células T. Os clones Leu 22, DFT-1 e MT1 podem identificar os epítomos do material fixado em formalina e processado em parafina, mostrando padrão de membrana. Este anticorpo é expresso em células T, células mielóides, plasmócitos e fracamente em histiócitos e plaquetas. Linfomas de células T apresentam positividade para CD43 em 90% dos casos, incluindo a leucemia/linfoma linfoblástica de células T. Os linfócitos B normais são negativos para CD43, mas a expressão em células B pode sustentar o diagnóstico de linfoma. Cerca de 30% dos linfomas de células B de baixo grau são positivos para CD43, especialmente aqueles que são CD5+, incluindo-se a maioria (60%-95%) dos LCM e LLC/LLCP; leucemia/linfoma linfoblástico de células B; e alguns casos (20%) do LZM extranodal tipo MALT (Higgins *et al.* 2008).

CD45RO (UCHL1)

O CD45RO é uma isoforma do CD45 encontrado nos timócitos e células T maduras. Além disso, granulócitos e monócitos também podem ser positivos com este anticorpo, enquanto que células B normais e células NK são negativas. Podem ser encontrados os clones UCHL1, A6 e OPD4, todos eficazes em tecido processado em parafina. Este anticorpo marca tanto células T normais quanto neoplásicas, sendo ferramenta útil para a identificação de linfomas com imunofenotipo T, diferenciando-os dos linfomas com

imunofenotipo B. As células coradas pelo CD45RO exibem marcação em padrão membrana (Norton *et al.* 1986, Davey *et al.* 1990, Poppema *et al.* 1991).

Perforina (5B10)

Perforina é uma proteína codificada pelo gene PRF1 (*pore forming protein*). Os linfócitos T citotóxicos e as células NK expressam positividade para perforina em forma de grânulos citoplasmáticos. Tem sido mostrado que quando liberados, estes grânulos formam poros na membrana citoplasmática das células alvo causando sua lise, num mecanismo semelhante ao induzido pelas proteínas do sistema complemento. Além dos linfócitos T citotóxicos e células NK, a perforina é expressa em linfócitos granulares e células T gamma/delta. A expressão de perforina é induzida significativamente em células T CD8 positivas, mais do que nas células T gamma/delta e células NK. O padrão de marcação deste anticorpo é granular citoplasmático (Lichtenheld *et al.* 1988, Peitsch *et al.* 1990, Hameed *et al.* 1992, Boulland *et al.* 1997).

Granzima B (GrB7)

A granzima B é um grânulo serinoprotease de 29 kDa, presente nos grânulos citoplasmáticos dos linfócitos T citotóxicos e células NK. Quando estas células sofrem estimulação antigênica, liberam perforina, que forma um poro transmembrânico por onde entra a granzima B, induzindo à fragmentação do DNA e posterior apoptose da célula alvo. Uma alta porcentagem de células T citotóxicas expressando granzima B em pacientes com LHC é indicativo de prognóstico desfavorável. O padrão de marcação deste anticorpo é semelhante ao da perforina, granular citoplasmático (Kummer *et al.* 1995, Cho *et al.* 1997, Oudejans *et al.* 1997).

FASN

A enzima ácido graxo sintase (FASN) é uma proteína que catalisa a síntese de ácidos graxos, a partir dos precursores de acetil-CoA e malonil-CoA. Em tecidos normais, a expressão de FASN é baixa, pois a maioria do suplemento de ácidos graxos é fornecida pelo regime alimentar. Expressão de FASN está aumentada em várias neoplasias malignas

como câncer de próstata, mama, ovário, pulmão, estômago, carcinoma oral, melanomas cutâneos e sarcomas de tecidos moles, incluindo linfomas. Este anticorpo apresenta uma marcação citoplasmática. Interessantemente, alguns estudos tem ligado a expressão de FASN com a angiogênese tumoral (Jayakumar *et al.* 1995, Nguyen *et al.* 2010).

CD45RB (LCA, 2B11+PD7/26)

Existem pelo menos cinco proteínas que fazem parte da família CD45, as quais são tirosina fosfatases presentes na superfície de quase todas as células hematolinfóides. O anticorpo anti-CD45 reconhece todas as isoformas desta glicoproteína, sendo considerado um pan de células linfóides. Marca células linfóides normais e neoplásicas, sendo ferramenta útil para a identificação de células tumorais de origem linfóide. A marcação com CD45 é transmembrana, estando expressa em células B e T, granulócitos, monócitos e macrófagos. Deve-se considerar que aproximadamente 1% a 7% dos linfomas são LCA negativos. As células LP do LHPLN são positivas, contrastando com as células HRS do LHC, que são negativas (Hendrickx *et al.* 2001).

EMA (E29)

O antígeno epitelial de membrana (EMA) é uma glicoproteína que pertence a um grupo heterogêneo de moléculas secretado pelo epitélio mamário. Além do leite, estas proteínas encontram-se presentes numa variedade de epitélios normais e neoplásicos. EMA é um anticorpo valioso para a detecção de metástases de carcinoma mamário, e pode ser útil para diferenciar carcinoma anaplásico de linfomas, assim como para a identificação de neoplasias malignas fusocelulares de origem epitelial. Em tecido normal mamário, a marcação é restrita á membrana das células ductais luminais, e em outros epitélios normais a marcação é citoplasmática. Em neoplasias, a marcação pode ser de membrana e/ou citoplasmática. Este anticorpo também reconhece células mesoteliais, plasmócitos, ductos sudoríparos, glândulas sebáceas, epitélios gastrico, da bexiga, respiratório, do colo do útero, ácinos e ductos mamários, células exócrinas do pâncreas, túbulos distais renais, endométrio, tireóide e vias biliares. EMA também está expresso em ampla variedade de neoplasias tais como sarcoma sinovial, mesotelioma, sarcoma epitelioide, e alguns casos de

tumores de células redondas, pequenas e azuis. Entre os linfomas, EMA pode ser expresso no LDGCB e variantes, LGCBRTH, LAGC de tipo T ou “null cell”, assim como as células LP do LHPLN (Delsol *et al.* 1984, Dejmek *et al.* 1997, Benharroch *et al.* 1998, Anagnostopoulos *et al.* 2000, Lim *et al.* 2002).

MUM-1 (MUMp)

A proteína MUM1 (multiple myeloma oncogene-1) é uma molécula de 50 kDa codificada pelo gene MUM1, originalmente identificada pelo seu envolvimento na translocação t(6;14) (p25;q32) observada no mieloma múltiplo, causando justaposição do gene MUM1 para o locus do gene da imunoglobulina de cadeia pesada (IgH). A expressão da proteína MUM1 é independente desta translocação, e além do mieloma múltiplo, podem ocorrer nos linfomas linfoplasmocíticos, linfomas plasmablasticos, LDGCB e células T ativadas. MUM1 é um fator de transcrição específico, fazendo parte do grupo de fatores reguladores de interferon (IRF). MUM1 contribui na regulação da expressão do gene da Ig na etapa final de diferenciação de células B no centro germinativo. Células normais que expressam esta proteína incluem os plasmócitos e células T ativadas. Uma ampla gama de neoplasias hematolinfóides, incluindo plasmocitoma, LDGCB, linfoma de células T/NK, linfomas de células T periféricos, LAGC e as células HRS do LHC expressam esta proteína (Yamagata *et al.* 1996, Iida *et al.* 1997, Gaidano *et al.* 2000, Tsuboi *et al.* 2000).

CD83

O antígeno CD83 é uma glicoproteína da superfamília dos receptores das Ig, com expressão em padrão de membrana em CDs (Hock *et al.* 2001). As CDs que expressam CD83 são células de Langerhans, as CDs dérmicas da pele, a subpopulação de CDs circulantes no sangue e CDs interdigitantes no tecido linfóide. A expressão de CD83 não é estritamente específica às CDs, uma vez que é expresso em níveis baixos por linfócitos dos centros germinativos, assim como expressão induzida após ativação de linfócitos B e T (Weissman *et al.* 1995, Zhou *et al.* 1995, McLellan *et al.* 1998, Hock *et al.* 2001).

PAX-5 (1EW)

O gene PAX-5 é essencial para a diferenciação de células B, existindo pelo menos quatro isoformas. PAX-5 codifica a proteína ativadora específica de células B (BSAP) de 50 kDa, sendo expresso pelas células B em todos os estágios de maturação, mas está reduzido ou é negativo durante a diferenciação terminal B. Além de células B, a expressão de PAX-5 pode ser observada no testículo e epidídimo. Do grupo de tumores de células pequenas, redondas e azuis, PAX-5 é expresso no carcinoma de células de Merkel e no carcinoma de células pequenas, que estão incluídos no diagnóstico diferencial de linfoma. O PAX-5 pode ser útil na caracterização do LHC, pois as células HRS são positivas para este anticorpo e negativo no LAGC (Krenacs *et al.* 1998, Dong *et al.* 2008, Desouki *et al.* 2010).

Ki-67 (MIB-1)

Ki-67 é uma proteína nuclear que apresenta duas isoformas de 345 e 395 kDa, estando expresso em todas as fases ativas do ciclo celular (G1, S G2 e M), sendo negativo nas células em repouso (fase G0). Durante a interfase, o antígeno pode ser detectado exclusivamente no interior do núcleo, ao passo que na mitose a maioria da proteína é transferida para a superfície dos cromossomos. O Ki-67 é rapidamente degradado quando a célula entra no estado não proliferativo, e parece não haver nenhuma expressão de Ki-67 durante os processos de reparação de DNA. Ki-67 permite avaliar a taxa de proliferação celular, e tem sido usado como indicador prognóstico nos tumores malignos (Lindboe *et al.* 2002, Jalava *et al.* 2006).

CD31

O CD31 é uma proteína transmembrana de cadeia única, de aproximadamente 135 kDa, pertencente à superfamília das Igs, que participa das interações adesivas entre as células endoteliais, bem como entre os leucócitos e células endoteliais. A ligação do CD31 à superfície dos leucócitos resulta na regulação positiva das integrinas dos leucócitos, estimulando a diapedese através do endotélio. Esta molécula também é chamada de molécula-1 de adesão celular endotelial plaquetária (PECAM-1). A marcação do CD31

pode ser observada nas junções das células endoteliais, e de forma difusa sobre a superfície dos megacariócitos, plaquetas, células mielóides, células NK e alguns subconjuntos de células T, bem como em células B precursoras. CD31 parece também participar dos processos de trombose, reparo e angiogênese. Em tumores vasculares benignos e malignos, CD31 tem sensibilidade de quase 100% (Parums *et al.* 1990, DeYoung *et al.* 1995).

CD34 (QBEnd 10)

O CD34 é uma proteína transmembrana de cadeia única, de aproximadamente 116 kDa. CD34 é expresso em células hematopoiéticas progenitoras imaturas, células endoteliais, fibroblastos embrionários e eventualmente nas células gliais do tecido nervoso. Os precursores linfoides imaturos de fenótipo B são positivos para CD34, e também para CD19, CD10, TdT. Aproximadamente 60% das leucemias linfóides B agudas, 40% das leucemias mielóides agudas, e 1% a 5% das leucemias linfóides T agudas expressam CD34. Alguns tumores mesenquimais podem ser positivos para o CD34, como o tumor gastrointestinal estromal (GIST) e tumor fibroso solitário (Karanikas *et al.* 2012).

CD105 (SN6h)

O CD105 também conhecido como endogлина, é uma proteína transmembrana e componente do receptor da molécula TGF-beta. Está formada por um homodímero de 180 kDa, com pontes de dissulfeto. Um pequeno grupo de células tronco progenitoras hematopoiéticas, são positivas para CD105, além de CD34. Este marcador além de reconhecer células endoteliais, identifica sinciciotrofoblasto, macrófagos ativados, fibroblastos e músculo liso. A expressão de CD105 também foi demonstrada em leucemia/linfoma linfoblástica de fenótipo B, leucemia mielóide aguda e mielo-monocítica, assim como na leucemia de células pilosas. O aumento na expressão de CD105 tem sido demonstrado em vasculatura tumoral, sugerindo associação com a proliferação de células endoteliais (Pierelli *et al.* 2001).

D2-40

O D2-40 identifica uma sialoglicoproteína de 40 kDa presente em vários tecidos incluindo os testículos fetais, tumores de células germinais testiculares, além de reagir especificamente com endotélio linfático, sendo negativo para o endotélio vascular sanguíneo. Em tecido neoplásico, o D2-40 pode ser útil na identificação de invasão linfática dos tumores primários. O padrão de marcação é caracterizado por ser linear. O citoplasma de células mioepiteliais de anexos cutâneas é marcado positivamente com D2-40. A positividade do D2-40 no sarcoma de Kaposi sugere que as células neoplásicas são derivadas dos vasos linfáticos (Ordóñez 2006).

Fator de Von Willebrand - vWF (F8/86)

O fator de von Willebrand (vWF) é uma glicoproteína com massa molecular variando de 500 kDa até mais de 10,000 kDa, sendo a proteína plasmática de maior peso molecular. A expressão do vWF está limitada às células endoteliais e megacariócitos, sendo encontrada nos corpos de Weibel Palade das células endoteliais, nos grânulos alfa dos megacariócitos e plaquetas, bem como na matriz subendotelial das paredes de vasos. O vWF é um mediador da adesão de plaquetas, facilitando a coagulação sanguínea nos locais de lesão vascular. A doença de von Willebrand é o distúrbio de sangramento mais comum, afetando 1% da população, conseqüente à deficiência qualitativa e quantitativa do vWF. Angiossarcomas de alto grau são pobres em corpos de Weibel-Palade, dando imunorreatividade para vWF em apenas 10%-15% dos casos; assim, o vWF é mais útil nos casos de hemangiomas e haemangioendoteliomas. Além do diagnóstico de tumores vasculares, o vWF é útil para a determinação da densidade microvascular, visto que destaca bem as células endoteliais (Lenting *et al.* 2012).

VEGF (VG1)

O gene humano VEGF, localizado no cromossomo 6p21.3, contém 8 exons separados por 7 introns. Como resultado de splicing alternativos nos exons, são geradas seis isoformas diferentes, VEGF-121, VEGF-145, VEGF-165, VEGF-183, VEGF-189 e VEGF-206, as quais são denominadas de acordo com o número de aminoácidos na cadeia

peptídica. A proteína VEGF nativa é uma glicoproteína homodimérica que se liga à heparina de 45 kDa. VEGF-121 é um polipeptídeo que não se liga a heparina, enquanto que VEGF-165 e VEGF-189 são mais básicas e ligam-se à heparina com alta afinidade. Destas três isoformas, VEGF-165 é a forma molecularmente predominante em células e tecidos normais. As outras isoformas de VEGF, VEGF-121 e VEGF-189, são detectadas na maioria das células nos tecidos que expressam o gene VEGF. A marcação deste anticorpo é tanto citoplasmática quanto de membrana, podendo marcar o estroma de praticamente todos os tecidos, e uma proporção variável de plasmócitos, fibroblastos e linfócitos. No sistema nervoso central de neonatos, as células de Purkinje do cérebro são positivas para VEGF. Marcação positiva de megacariócitos em amostras de medula óssea tem sido observada (Podar *et al.* 2005).

Mast cell tryptase (AA1)

A triptase é o mais abundante dos grânulos de secreção derivados de serina proteinase dos mastócitos, e tem sido utilizada como marcador de mastócitos. Na sua forma enzimaticamente ativada, a triptase de mastócitos é um tetrâmero não covalente de 132 kDa, capaz de ativar mediadores importantes envolvidos nas reações alérgicas e na broncoconstrição das vias aéreas. A triptase também tem efeito mitogênico em células do músculo liso das vias aéreas e do pulmão humano, assim como, fibroblastos dérmicos. Através da IQ, anti-triptase é largamente usada para a marcação de mastócitos em vários tecidos humanos (Payne *et al.* 2004).

CD1a (010)

Existem quatro isoformas de proteínas CD1: CD1a, CD1b, CD1c e CD1d. O CD1a é uma classe não polimórfica de MHC I relacionada com a glicoproteína de superfície celular expressa em associação com β 2-microglobulina. CD1a, CD1b e CD1c são geralmente expressas nas APCs. O CD1d é expresso no epitélio gastrointestinal e linfócitos B. O CD1a está expresso nas células de Langerhans, CD interdigitantes e em 70% dos timócitos corticais. A histiocitose de células de Langerhans é caracteristicamente positiva para CD1a, mas o xantogranuloma juvenil e alguns casos de leucemia/linfoma linfoblástico

de células T também são positivos para CD1a. A positividade de CD1a também pode ser útil para distinguir carcinomas do timo de neoplasias pulmonares (Schmuth *et al.* 2001, Lau *et al.* 2008).

CD123 (BR4MS)

O CD123 é uma proteína que corresponde a 101 aminoácidos, também chamada de receptor de interleucina-3 (IL-3R), que auxilia na transmissão do sinal da IL-3, uma citocina solúvel importante no sistema imune. O CD123 é encontrado nas células progenitoras pluripotentes, e quando ativado induz à fosforilação de tirosina no interior da célula, promovendo a proliferação e diferenciação celular das linhagens celulares hematopoiéticas. O clone BR4MS detecta a proteína CD123 em diversos tecidos, incluindo as células testiculares de Leydig, CDs plasmocitóides, vênulas endoteliais altas das amígdalas, macrófagos alveolares, sinciciotrofoblasto, e eventualmente células epiteliais do cólon e leucócitos da medula óssea. Este clone é recomendado para a detecção de CD123 em tecidos normais e neoplásicos, especialmente como auxiliar na identificação de neoplasias de CDs plasmocitóides (Moretti *et al.* 2001, Garnache-Ottou *et al.* 2009).

CD207 (Langerina)

Langerina é uma proteína transmembrana, membro da família da lectina tipo C, específica de células de Langerhans, que inicia a formação dos grânulos de Birbeck. Langerina é mediadora da endocitose de antígenos não peptídicos que contenham manose, N-acetilglucosamina e fucose, expressos por micobactérias e fungos. Esta proteína é característica das CDs imaturas da epiderme e da mucosa, mas também é expressa em vários outros tipos de CDs do epidídimo, mucosa, tecido linfóide, timo, e pulmão. Este anticorpo auxilia no diagnóstico da histiocitose de células de Langerhans, suportando os achados da microscopia eletrônica para mostrar os grânulos de Birbeck (Verdijk *et al.* 2005, Lau *et al.* 2008).

S-100

S-100 é uma família de proteínas de baixo peso molecular, as quais interagem com cálcio e atuam como reguladoras do mesmo. Foi isolada pela primeira vez a partir do sistema nervoso central, sendo uma proteína 100% solúvel em sulfato de amônio a pH neutro, razão do nome S-100. Esta família compreende pelo menos 19 membros que são diferencialmente expressos em grande número de tipos celulares. S-100 está normalmente presente em células derivadas da crista neural, porém, a marcação positiva com este anticorpo é observada em células de Langerhans, melanócitos, assim como, macrófagos, CDs interdigitantes dos linfonodos, células reticulares medulares epiteliais do timo, condrócitos, adipócitos, células mioepiteliais em glândulas salivares e de mama, células de Schwann, corpúsculos de Pacini e células gliais do tecido nervoso. Pode ser observada fraca marcação em células epiteliais da mama e glândula sudorípara. O valor diagnóstico é limitado pela expressão ampla desta proteína, no entanto, é bastante útil para o diagnóstico de melanoma. Pode ser útil também no diagnóstico diferencial entre tumores cartilaginosos e tumores ósseos. Também pode contribuir para o diagnóstico de neoplasias neurais, histiocitose de células de Langerhans, condroblastoma e lesões de origem histiocítica/dendrítica (Ilg *et al.* 1996, Pileri *et al.* 2002).

FXIIIa (E980.1)

O fator XIIIa é uma pró-enzima que ajuda na estabilização mecânica do coagulo de fibrina, aumentando a sua resistência à proteólise. É uma transglutaminase que circula no plasma como um heterotetrâmero de duas subunidades catalíticas A e duas subunidades B de transporte. Também é conhecida como fibrinoglicase ou fator estabilizador de fibrina, sendo a última enzima gerada na cascata da coagulação do sangue. A marcação com este anticorpo é predominantemente citoplasmática, mas ocasionalmente pode ser nuclear. Células positivas para este anticorpo incluem os megacariócitos, monócitos/macrófagos, CDs interdigitantes em linfonodos reativos, dendrócitos dérmicos, células mesenquimais tipo fibroblastos e as células de Kupffer no fígado. Também é positivo em lesões fibrohistiocíticas, incluindo o fibrohistiocitoma benigno (Cotton *et al.* 1990, Hards *et al.* 2012).

CAPÍTULO 1¹

ORAL DIFFUSE LARGE B-CELL LYMPHOMA WITH HODGKIN/REED-STERNBERG-LIKE CELLS: A COMPARATIVE STUDY.

Victor Hugo Toral Rizo, DDS, PhD student,¹ Wilson Delgado Azañero, DDS, PhD,² Adalberto Mosqueda-Taylor, DDS, PhD,³ Oslei Paes Almeida, DDS, PhD,¹ Jorge Esquiche León, DDS, PhD.⁴

¹ Oral Pathology Section, Department of Oral Diagnosis, Piracicaba Dental School, University of Campinas-FOP/Unicamp, Piracicaba, São Paulo, Brazil.

² Department of Oral Medicine, Oral Surgery and Oral Pathology, Faculty of Dentistry, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Perú.

³ Department of Health Care, Universidad Autónoma Metropolitana, Xochimilco, México.

⁴ Oral Pathology, Department of Stomatology, Dentistry School of Ribeirão Preto, University of São Paulo (USP), Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil.

Running Title: Non-Hodgkin lymphoma with Hodgkin/Reed-Sternberg-like cells.

Corresponding author:

Victor Hugo Toral Rizo

Departamento de Diagnóstico Oral, Área de Patologia Oral. Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

Av. Limeira 901, Barrio Areião. Piracicaba, São Paulo, Brazil.

CEP 13.414-903.

Tel.: +55 19 2106-5315; Fax: +55 19 2106-5218

E-mail: toralrizo@hotmail.com

¹ Este trabalho foi realizado no formato alternativo conforme Deliberação CCPG/002/06 da Comissão Central de Pós-Graduação (CCPG) da Universidade Estadual de Campinas. Este trabalho foi submetido na Oral Oncology OO-S-13-00517.

ABSTRACT

Objective. Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL), can present cells morphologically similar to Hodgkin/Reed-Sternberg (HRS) cells of classical Hodgkin lymphoma (cHL). To better understand these cells in oral DLBCL, the aim of this study was to compare the histological and immunohistochemical aspects of primary nodal cHL with oral DLBCL presenting HRS-like cells (DLBCL-HRS). Cases of oral cHL reported in the English-language literature were reviewed and discussed. **Study design.** Seven cases of DLBCL-HRS and 8 of nodal cHL were included. Immunoeexpression of CD3, CD15, CD20, CD30, CD43, LCA, CD45RO, CD79a, CD83, EMA, MUM-1, PAX-5, perforin, granzyme B, FASN, Ki-67, LMP-1; and EBER1/2, were assessed. **Results.** All cHL were CD30 positive, while LCA, CD20, and CD79a were negative. CD15, EBV, CD83, and FASN were positive in all but one case, while PAX-5 and MUM-1 were positive in half the cases. Five DLBCL-HRS cases were classified as DLBCL, NOS, and 2 cases as EBV-positive DLBCL of the elderly. HRS-like cells of all cases of the former group were LCA, CD20, CD79a, and FASN positive, while CD15 was negative. CD30 were positive in 2 cases and EBV in 1. CD83, PAX-5, and MUM-1 were positive in all except for one case. In the latter group, HRS-like cells of both cases were positive for LCA, CD30, CD79a, EBV, CD83, PAX-5, MUM-1, and FASN, while CD15 was negative. CD20 was positive in one case. **Conclusion.** DLBCL-HRS should be included in the differential diagnosis of oral cHL. When evaluating these cases, a detailed morphologic and broad IHC analysis for the correct diagnosis is recommended.

Key-Words: Hodgkin lymphoma; oral cavity; diffuse large B-cell lymphoma; Hodgkin/Reed-Sternberg-like cells.

INTRODUCTION

Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) is the most common type of non-Hodgkin lymphoma (NHL), accounting for 30% of all NHLs.(Harris *et al.* 1994, Armitage and Weisenburger 1998, Swerdlow *et al.* 2008) Most cases are nodal, but up to 40% are extranodal. DLBCL occurs most frequently in the 7th decade, but it may also affect children and young adults, with a slight male predominance.(Swerdlow *et al.* 2008) Underlying immunodeficiency is a significant risk factor, with most of these cases associated to Epstein-Barr virus (EBV) infection.(Greiner *et al.* 1995, Armitage and Weisenburger 1998, Swerdlow *et al.* 2008) Microscopically, DLBCL may show high number of reactive cells, fibrosis, sclerosis and in fast-growing tumors necrosis.(Ioachim and Madeiros 2009) Interestingly, some DLBCLs may present neoplastic cells morphologically similar to Hodgkin/Reed-Sternberg (HRS) cells (DLBCL-HRS).(Gurbuxani *et al.* 2009)

NHLs of the oral cavity are rare, accounting for 3–5% of all oral malignancies. DLBCL is the prevalent lymphoma in the mouth, involving mainly the palate, gingiva and tongue.(Derk *et al.* 2004, Keszler *et al.* 2008) Hodgkin lymphomas (HLs) correspond to 30% of all lymphomas, virtually all cases involving the lymph nodes, particularly of the cervical region of young adults. Most HLs are classified as classical, showing HRS cells scattered in a background of predominant polymorphous reactive inflammatory cells and fibrous stroma, often ringed by T-cells in a rosette-like manner.(Pileri *et al.* 2002, Swerdlow *et al.* 2008, Ioachim and Madeiros 2009)

Primary extranodal cHL are very rare (<1%), with case reports involving the gastrointestinal tract, lungs, thyroid, skin, genitourinary system, bone, central nervous system, and oral cavity.(Kumar *et al.* 2000, Whitt *et al.* 2007, Madan *et al.* 2010, Darling *et al.* 2012, Li *et al.* 2012) To our knowledge, there are 20 cases of oral cHL reported in the English-language literature since 1973 and until now (**Table 1**), most diagnosed through a limited immunohistochemical (IHC) panel.

The aim of this study was to compare primary nodal cHL with oral DLBCL-HRS through a broad IHC panel and *in situ* hybridization (ISH) to EBV, to better characterize this

latter group and also to compare the results with oral cHL reported in the English-language literature.

MATERIALS AND METHODS

All cases used on this work were classified according to the 2008 World Health Organization (WHO) classification of tumors of haematopoietic and lymphoid tissues. (Swerdlow *et al.* 2008) Eight cases corresponded to cHL, the most involved the cervical lymph nodes and 7 cases were oral DLBCL-HRS (5 classified as DLBCL, not otherwise specified [DLBCL, NOS], and 2 as EBV-positive DLBCL of the elderly). Moreover, for comparative purposes, 1 case of nodular lymphocyte predominant Hodgkin lymphoma (NLPHL) and 2 cases of extraoral DLBCL-HRS (classified as DLBCL, NOS), were also included (**Tables 2 and 3**).

All biopsies were fixed in 10% formalin, embedded in paraffin, and 3- μ m sections mounted in 3-aminopropyltriethoxysilane slides were used for H&E staining and IHC analysis.

A large panel of antibodies was used for diagnosis and comparison of these lymphomas, including CD3, CD15, CD20, CD30, CD43, LCA (CD45RB), CD45RO, CD79a, CD83, EMA, MUM-1, PAX-5, perforin, granzyme B, FASN, Ki-67, and LMP-1. Briefly, after hydration and treatment with hydrogen peroxide (3%), antigen retrieval was done with the help of pressure cooker using sodium citrate buffer (pH6). Incubation overnight with the primary antibody was followed by the secondary antibody conjugated with streptavidin-biotin-peroxidase (Kit LSAB, DAKO, Carpinteria, CA, USA), developed with diaminobenzidine and counterstaining with Carazzi's hematoxylin. ISH staining for EBV-encoded small nuclear RNA1/2 (EBER1/2) was performed using peptide nucleic acid (PNA) probes conjugated with 5-carboxy-fluorescein complementary to EBV EBER1 and EBER2 loci and substrate 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate/4-nitroblue tetrazolium chloride (BCIP/NBT) (EBER, PNA probes, DAKO, Copenhagen, Denmark).

RESULTS

Patients with cHL comprised 6 males and 2 females, ranging from 6-78 years, with a mean of 47 years. Five cases were classified as nodular sclerosis and 3 as mixed cellularity subtype (**Table 2**). All cases were positive for CD30, while CD15, EBV, CD83, and FASN were positive in all but one case. PAX-5, MUM-1, and granzyme B positivity was observed in 5, 4, and 2 cases, respectively. LCA, CD20, and CD79a were negative, as all other markers used. The mean Ki-67 proliferative index was 46.3% (**Table 4**).

The only case of NLPHL involving the supraclavicular lymph node in a 26-year-old female, showed a nodular pattern, and large cells with single, folded, multilobated nuclei admixed with abundant reactive lymphocytes. Both CD30 and CD15 were negative, whereas LCA, CD20, CD79a, PAX-5, EMA, CD83, and FASN were positive. The Ki-67 proliferative index was 60%. All other markers were negative.

In the DLBCL-HRS group, 5 patients were females and 4 males, with a mean age of 55 years (range, 22-83 years). Seven out of 9 cases involved the mouth, 4 the alveolar ridge and cheek, tongue and palate with one case each. The other 2 cases affected the cervical lymph node and periorbital skin (**Table 3**). Microscopically, all cases showed large mononuclear and binucleated cells with prominent eosinophilic nucleoli and abundant cytoplasm, resembling HRS cells admixed with numerous large cells. These large cells exhibited a broad cellular heterogeneity, with a predominant centroblastic or immunoblastic morphology. A significant reactive cellular infiltrate was present, including lymphocytes, histiocytes, neutrophils, and variable number of eosinophils.

Considering the 7 cases of DLBCL-HRS involving the mouth, 5 were classified as DLBCL, NOS, and 2 as EBV-positive DLBCL of the elderly. In the former group, all cases were positive for LCA, CD20, CD79a, FASN, and negative for CD15; while CD83, PAX-5, and MUM-1 were positive in all but one case. CD30 and EBV were positive in 2 and 1 case, respectively. Ki-67 proliferative index was 42.8% (**Fig. 1**). All other markers were negative. One case of EBV-positive DLBCL of the elderly showed broad sheets of large atypical cells resembling immunoblasts, centroblasts, and HRS-like cells with distinct nucleoli. The other case displayed a multinodular proliferation of polymorphous cellular infiltrate, embedded in a fibrous stroma, which exhibited variable degree of plasmacytic

differentiation admixed with immunoblasts and HRS-like cells (**Fig. 2**). Both cases were positive for LCA, CD30, CD79a, EBV, CD83, PAX-5, MUM-1, and FASN; while CD15 was negative. Interestingly, one case showed negativity for CD20 and positivity for perforin. Ki-67 proliferative index was 50%. All other markers were negative (**Tables 4 and 5**).

The 2 extraoral DLBCL-HRS cases were classified as DLBCL, NOS. One case was CD30 positive, while both cases were CD15 negative. EBV was detected in both cases. As for the oral cases, CD20, CD79a, PAX-5, CD83, FASN, and MUM-1 were positive in both cases. Interestingly, one case was LCA negative, and the other showed aberrant expression of CD43 and CD45RO. The Ki-67 proliferative index was 52% (**Table 4**). The clinicopathological features of oral cHL cases reported to date in the English-language literature are shown in the **Table 1**, and highlighted in the discussion section.

DISCUSSION

The objectives of the current study were to analyze and compare the microscopical features and IHC profile of primary nodal cHL and oral DLBCL-HRS cases, in order to better characterize this latter group. We also included one case of NLPHL and two cases of extraoral DLBCL-HRS. All nodal cHLs exhibited typical morphological and IHC features. By IHC, CD30 was positive in all cHLs, while all but one case were CD15 and EBV positive; LCA, CD20, and CD79a were negative. The only NLPHL case was LCA, CD20, and CD79a positive, while CD30, CD15, and EBV were negative. In all HL cases, similar LMP-1 results were obtained by ISH for EBER1/2.

cHL occur almost exclusively in lymph nodes, particularly cervical, supraclavicular, and mediastinal, and primary extranodal presentations are very rare accounting for less than 1% of all cases.(Gandhi *et al.* 2010) Primary extranodal cHLs have been reported in the gastrointestinal tract, lungs, breast, skin, genitourinary system, bone, and central nervous system.(Pranteda *et al.* 2010, Ghimire *et al.* 2011, Bautista-Quach *et al.* 2012, Geramizadeh *et al.* 2012)

cHL affecting the oral cavity is extremely rare. After an extensive review, we have found 20 oral cHL cases reported in the English-language literature (**Table 1**).(Stern *et al.* 1973, Peters *et al.* 1977, Bathard-Smith *et al.* 1978, Cohen *et al.* 1984, Ronchi *et al.* 1988,

Lello *et al.* 1989, Mathews *et al.* 1989, Papo *et al.* 1991, Laskaris *et al.* 1992, Tanaka *et al.* 1992, Jamshed *et al.* 1997, Vigneswaran *et al.* 1997, Warburton *et al.* 2003, Fornatora *et al.* 2004, Whitt *et al.* 2007, Gonzalez-Fontal *et al.* 2011, Darling *et al.* 2012, Kammerer *et al.* 2012, Minicucci *et al.* 2013) Most if not all of these cases, lack a detailed morphological description as well as a broad IHC analysis, that would be helpful to better characterize these lymphomas and exclude the possibility of other oral lymphoid neoplasms presenting HRS-like cells with positivity for CD30 and/or CD15 as well as for EBV. In fact, in 8 of these cases the diagnosis was made after morphological analysis alone (cases 1 to 8),(Stern and Shensa 1973, Peters *et al.* 1977, Bathard-Smith *et al.* 1978, Cohen *et al.* 1984, Ronchi *et al.* 1988, Lello and Raubenheimer 1989, Mathews *et al.* 1989, Papo *et al.* 1991) two cases were reported without IHC data (cases 14 and 15),(Fornatora *et al.* 2004) and one case did not included CD30 and CD15 in the IHC analysis (case 9).(Tanaka *et al.* 1992) In the remaining ten cases,(Laskaris *et al.* 1992, Jamshed *et al.* 1997, Vigneswaran *et al.* 1997, Warburton *et al.* 2003, Whitt *et al.* 2007, Gonzalez-Fontal *et al.* 2011, Darling *et al.* 2012, Kammerer *et al.* 2012, Minicucci *et al.* 2013) IHC analysis was performed using CD30 and/or CD15, variably complemented with LCA, CD20, and T-cell markers, and in only 1 case each IHC(Gonzalez-Fontal *et al.* 2011) or ISH(Darling *et al.* 2012) for EBV was performed (**Table 1**). CD79a has been rarely included in the IHC panel for evaluating oral cHL (only the case 9 of the **Table 1** has used the MB-1 antibody).(Tanaka *et al.* 1992). In fact, the expression of different B-cell markers is described as characteristically absent from HRS cells in cHL, including CD20, CD79a, BOB.1, and OCT-2. Although occasional cHL cases have been found to express CD20 on a minority of tumor cells, CD79a expression is a very unusual finding and can be considered to argue strongly against the diagnosis of cHL.(Garcia *et al.* 2005) As a result, a comparative analysis between oral cHL cases reported in the English-language literature, with other possible diagnosis, is difficult. More recently, oral cHL cases have been reported and assessed through a broad IHC panel, including ISH for EBER1/2.(Gonzalez-Fontal *et al.* 2011, Darling *et al.* 2012)

HRS-like cells has been found in cases of acute infectious mononucleosis, follicular lymphoma, chronic lymphocytic leukemia, and nodal peripheral T-cell lymphoma.(Quintanilla-Martinez *et al.* 1999, Kanzler *et al.* 2000, Bayerl *et al.* 2004) HRS-

like cells may have the classic HL phenotype (CD15+/CD30+), or in some cases, the immunophenotype may resemble an activated B-cell (CD15-/CD30+/CD20+).(Quintanilla-Martinez *et al.* 1999)

In the current study, we have showed that oral DLBCL-HRS should be included in the differential diagnosis of oral cHL, and the use of a broad IHC panel, including LCA, CD79a, CD20, and EBV (LMP-1 and EBER1/2), is essential for the correct diagnosis. According to 2008 WHO classification of tumors of haematopoietic and lymphoid tissues,(Swerdlow *et al.* 2008) 5 of our cases of oral DLBCL-HRS were classified as DLBCL, NOS, and 2 as EBV-positive DLBCL of the elderly. All 5 cases of DLBCL, NOS, were LCA+/CD20+/CD79a+/CD15-, while CD30 positivity was found in only 2 cases, one of them was EBV positive. The 2 cases of EBV-positive DLBCL of the elderly were LCA+/CD79a+/CD30+/CD15-/EBV+. Positivity for CD20 or perforin was detected in only 1 case.

As mentioned, the most recent 2008 WHO has attempted unraveling specific entities from the DLBCL group. The most of these lymphomas continue to be defined by their nuclear size and fall into the somewhat “orphan” category of DLBCL, NOS(Gurbuxani *et al.* 2009, Martelli *et al.* 2013) By definition, before the diagnosis of DLBCL, NOS, is rendered, the possibility that the neoplasm represents one of the specific subtypes of DLBCL group should be excluded. In the current series of oral DLBCL, NOS (n=5), immunoblastic variant was observed in 2 cases and centroblastic variant in 1 case. The other 2 cases were unclassifiable. This demonstrates the overwhelming complexity in classifying this morphologic heterogeneous group.

EBV-positive DLBCL of the elderly usually shows large lymphoid cells in a background of reactive cells, including small lymphocytes, plasma cells, and epithelioid cells. It may also show a broad range of B-cell maturation, including centroblasts, immunoblasts, and HRS-like cells.(Adam *et al.* 2011, Menon *et al.* 2012) This large spectrum of cells led to classify this lymphoma into two subtypes, large cell and polymorphic. The large cell subtype is characterized by predominantly sheets of large transformed B-cells, while the polymorphic shows cells of different shape and size, including centroblasts and plasmablasts, admixed with a reactive infiltrate. The tumor cells

express CD20 and/or CD79a and harbor EBV infection. CD30 is positive in about 75% of the cases.(Adam *et al.* 2011, Bautista-Quach *et al.* 2012, Martelli *et al.* 2013)

There is another subtype of large B-cell lymphomas, referred as mediastinal gray zone lymphoma, which shows clinical, morphologic and immunophenotype features that overlap with cHL. This is the case of the so-called B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between DLBCL and cHL, which often affect the mediastinal region of young male adults, with or without involvement of the supraclavicular lymph nodes.(Menon *et al.* 2012) In these cases, the common immunophenotype include the expression of LCA, CD20, and CD79, in addition to CD15 and CD30, while the EBV positivity is variable. Moreover, different from cHL, the transcription factors PAX-5, BOB.1, and OCT-2 are usually positive.(Gualco *et al.* 2012) In the current DLBCL-HRS series, the extranodal location, lack of broad spectrum of neoplastic cytological appearances, fibrotic stroma poorly defined, negativity for CD15, and variable positivity for CD30, has excluded this diagnostic possibility.

The transcription factors B-cell specific activator protein (BSAP)/PAX-5 and multiple myeloma-1/interferon regulatory factor-4 (MUM1/IRF-4) were used in this study because of their expression at different stages of B-cell differentiation and their expression in tumor cells of cHL. However, it was not found a significant difference when comparing these markers between cHL with oral DLBCL-HRS (**Table 5**). Moreover, it was also found similar expression of CD83 in these two lymphoma groups. In fact, CD83, a dendritic cell lineage associated antigen, is also expressed by HRS cells and germinal center B-cells.(Bosshart 2002, Cao *et al.* 2005)

Fatty acid synthase (FASN) is the metabolic enzyme responsible by endogenous synthesis of saturated long-chain fatty acid(Chirala *et al.* 2004) FASN is down-regulated in most normal human tissues, because cells preferentially use circulating dietary fatty acids for the synthesis of new structural lipids. On the other hand, FASN is overexpressed in a variety of human cancers, including lymphoma(Kant *et al.* 2012) FASN was uniformly expressed on neoplastic cells of DLBCL-HRS cases, while in HL cases the neoplastic cells were highlighted by the strong cytoplasmic expression of FASN, contrasting with the weak to negative expression in the predominant reactive lymphocytes.

Aberrant expression of T-cell associated antigens on B-cell NHLs, other than CD43, is a known but uncommonly observed phenomenon, including CD2, CD3, CD4, CD7, CD8, and CD45RO. Chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma is the most cited B-cell malignant neoplasm with aberrant co-expression of T-cell associated antigens. Other B-cell lymphomas, including DLBCL, also may display this aberrant expression.(Oliveira *et al.* 2012) Moreover, uncommonly, some DLBCL can also express cytotoxic molecules(Oliveira *et al.* 2012) T-cell marker and/or cytotoxic molecule immunoexpression has been demonstrated on HRS cells in approximately 5% to 20% of cHLs, and it was significantly associated with an adverse prognosis.(Kanavaros *et al.* 1999, Asano *et al.* 2006, Oliveira *et al.* 2012) In the current study, we have found positivity for cytotoxic molecules in two cases of cHL and in one case of EBV-positive DLBCL of the elderly, while one case of extraoral DLBCL, NOS, showed positivity for both CD43 and CD45RO.

Considering the detection of EBV by immunohistochemistry (LMP-1) or ISH (EBER1/2) in DLBCL, it is more reliable to use ISH as it covers all latent phase of EBV infection. In fact, in the current series of DLBCL, NOS, EBER1/2 positivity was detected in 5 out of 9 cases, and of these 5 cases, only 3 cases were also LMP-1 positive. The demonstration of EBV in the HRS-like cells strongly suggests that EBV may play a pivotal role in the pathogenesis and transformation of these cells.(Parrens *et al.* 2002)

In conclusion, DLBCL-HRS should be included in the differential diagnosis of oral cHL. When evaluating these cases, a detailed morphologic study and broad IHC analysis supported by EBER1/2 expression is recommended.

REFERENCES

1. Harris NL, Jaffe ES, Stein H, et al. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood*. Sep 1 1994;84(5):1361-1392.
2. Swerdlow SH, Jaffe E, Pileri A, Stein H, al. e. *WHO Classification of tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. Fourth ed. ed. Lyon, France: IARC; 2008.
3. Armitage JO, Weisenburger DD. New approach to classifying non-Hodgkin's lymphomas: clinical features of the major histologic subtypes. Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *J Clin Oncol*. Aug 1998;16(8):2780-2795.

4. Greiner TC, Medeiros LJ, Jaffe ES. Non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer*. Jan 1 1995;75(1 Suppl):370-380.
5. Ioachim H, Madeiros J. *IOACHIM'S Lymph Node Pathology*. . Fourth ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins; 2009.
6. Gurbuxani S, Anastasi J, Hyjek E. Diffuse large B-cell lymphoma--more than a diffuse collection of large B cells: an entity in search of a meaningful classification. *Arch Pathol Lab Med*. Jul 2009;133(7):1121-1134.
7. Keszler A, Piloni MJ, Paparella ML, Soler Mde D, Ron PC, Narbaitz M. Extranodal oral non-Hodgkin's lymphomas. A retrospective study of 40 cases in Argentina. *Acta Odontol Latinoam*. 2008;21(1):43-48.
8. Derk CT, Conway RT, Jimenez SA. Primary B-cell lymphoma of the tongue in a patient with systemic sclerosis. *Oral Oncol*. Jan 2004;40(1):103-106.
9. Pileri SA, Ascani S, Leoncini L, et al. Hodgkin's lymphoma: the pathologist's viewpoint. *J Clin Pathol*. Mar 2002;55(3):162-176.
10. Li Y, Wang XB, Tian XY, Li B, Li Z. Unusual primary osseous Hodgkin lymphoma in rib with associated soft tissue mass: a case report and review of literature. *Diagn Pathol*. 2012;7:64.
11. Darling MR, Cuddy KK, Rizkalla K. Hodgkin lymphoma of the oral mucosa. *Head Neck Pathol*. Dec 2012;6(4):507-510.
12. Madan M, Arora R, Singh J. Solitary skeletal lesion as the primary manifestation of Hodgkin's lymphoma: a case report. *Acta Cytol*. Sep-Oct 2010;54(5 Suppl):1035-1038.
13. Whitt JC, Dunlap CL, Martin KF. Oral Hodgkin lymphoma: a wolf in wolf's clothing. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. Nov 2007;104(5):e45-51.
14. Kumar S, Fend F, Quintanilla-Martinez L, et al. Epstein-Barr virus-positive primary gastrointestinal Hodgkin's disease: association with inflammatory bowel disease and immunosuppression. *Am J Surg Pathol*. Jan 2000;24(1):66-73.
15. Gandhi JS, Mehta A, Sharma A, Kamboj M. Primary Hodgkin lymphoma of the ileum. *J Cancer Res Ther*. Jul-Sep 2010;6(3):342-343.
16. Bautista-Quach MA, Ake CD, Chen M, Wang J. Gastrointestinal lymphomas: Morphology, immunophenotype and molecular features. *J Gastrointest Oncol*. Sep 2012;3(3):209-225.
17. Geramizadeh B, Farzaneh M, Ramzi M, Momenzadeh OR. Primary Solitary Osseous Hodgkin's Lymphoma: A Case Report and Review of the Literature. *Iran Red Crescent Med J*. May 2012;14(5):313-315.
18. Ghimire P, Wu GY, Zhu L. Primary gastrointestinal lymphoma. *World J Gastroenterol*. Feb 14 2011;17(6):697-707.
19. Pranteda G, Osti MF, Cox MC, et al. Primary cutaneous Hodgkin lymphoma. *J Am Acad Dermatol*. Aug 2010;63(2):e52-53.
20. Stern NS, Shensa DR. Hodgkin's disease of the mandible: report of case. *J Oral Surg*. Aug 1973;31(8):628-631.
21. Peters RA, Beltaos E, Greenlaw RH, Schloesser LL. Intraoral extranodal Hodgkin's disease. *J Oral Surg*. Apr 1977;35(4):311-312.
22. Bathard-Smith PJ, Coonar HS, Markus AF. Hodgkin's disease presenting intra-orally. *Br J Oral Surg*. Jul 1978;16(1):64-69.

23. Cohen MA, Bender S, Struthers PJ. Hodgkin's disease of the jaws. Review of the literature and report of a case. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. Apr 1984;57(4):413-417.
24. Ronchi P, Epifani C, Lunetta PH. Hodgkin's disease of the jaw: report of a case. *J Oral Maxillofac Surg*. Feb 1988;46(2):155-158.
25. Lello GE, Raubenheimer E. Hodgkin's disease presenting in the maxilla. A case report. *Int J Oral Maxillofac Surg*. Feb 1989;18(1):7-9.
26. Mathews FR, Appleton SS, Wear DJ. Intraoral Hodgkin's disease. *J Oral Maxillofac Surg*. May 1989;47(5):502-504.
27. Papo T, Oksenhendler E, Bouvet E, Marche C, Monteil JP, Clauvel JP. Hodgkin's disease of the tongue in a homosexual HIV-infected patient. *Am J Hematol*. Jun 1991;37(2):143.
28. Tanaka J, Yoshida K, Suzuki M, Sakata Y. Hodgkin's disease of the maxillary gingiva. A case report. *Int J Oral Maxillofac Surg*. Feb 1992;21(1):45-46.
29. Laskaris G, Stergiou G, Kittas C, Scully C. Hodgkin's disease involving the gingiva in AIDS. *Eur J Cancer B Oral Oncol*. Jul 1992;28B(1):39-41.
30. Jamshed A, Allard WF, Mourad WA, Rostom AY. Primary Hodgkin's disease of the mandible: a case report and review of the literature. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. Jun 1997;83(6):680-684.
31. Vigneswaran N, Tilashalski KR, Peters GE, Reddy VV, Rodu BK. Ulcerated tumor mass involving the right base of the tongue. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. Nov 1997;84(5):461-464.
32. Warburton G, Childs RC, Charles M, Brahim JS. Hodgkin's lymphoma: a case report involving the mandible. *J Oral Maxillofac Surg*. Dec 2003;61(12):1492-1496.
33. Fornatora M, Reich R, Freedman P. Extranodal Hodgkin's lymphoma of the oral soft tissue [abstract]. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2004;98(2):2007-2008.
34. Gonzalez-Fontal G, Rosales J, Jaramillo R, Henao-Martínez A. Primary extranodal, extralymphatic Hodgkin lymphoma of the mandible. *Case Report Med*. 2011;2011:2011-2014.
35. Kammerer PW, Schiegnitz E, Hansen T, Draenert GF, Kuffner HD, Klein MO. Multiple primary enoral soft tissue manifestations of a Hodgkin lymphoma-case report and literature review. *Oral Maxillofac Surg*. Apr 18 2012.
36. Minicucci E, Fracalossi T, de Melo B, Furlfaro J, MA. D. PP027: Primary Hodgkin's lymphoma: A rare manifestation in the hard palate. *Oral Oncol*. 2013;49, Supplement 1:S102.
37. Garcia JF, Mollejo M, Fraga M, et al. Large B-cell lymphoma with Hodgkin's features. *Histopathology*. Jul 2005;47(1):101-110.
38. Bayerl MG, Bentley G, Bellan C, Leoncini L, Ehmann WC, Palutke M. Lacunar and reed-sternberg-like cells in follicular lymphomas are clonally related to the centrocytic and centroblastic cells as demonstrated by laser capture microdissection. *Am J Clin Pathol*. Dec 2004;122(6):858-864.
39. Kanzler H, Kuppers R, Helmes S, et al. Hodgkin and Reed-Sternberg-like cells in B-cell chronic lymphocytic leukemia represent the outgrowth of single germinal-center B-cell-derived clones: potential precursors of Hodgkin and Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease. *Blood*. Feb 1 2000;95(3):1023-1031.

40. Quintanilla-Martinez L, Fend F, Moguel LR, et al. Peripheral T-cell lymphoma with Reed-Sternberg-like cells of B-cell phenotype and genotype associated with Epstein-Barr virus infection. *Am J Surg Pathol*. Oct 1999;23(10):1233-1240.
41. Martelli M, Ferreri AJ, Agostinelli C, Di Rocco A, Pfreundschuh M, Pileri SA. Diffuse large B-cell lymphoma. *Crit Rev Oncol Hematol*. Jan 30 2013.
42. Menon MP, Pittaluga S, Jaffe ES. The histological and biological spectrum of diffuse large B-cell lymphoma in the World Health Organization classification. *Cancer J*. Sep-Oct 2012;18(5):411-420.
43. Adam P, Bonzheim I, Fend F, Quintanilla-Martinez L. Epstein-Barr virus-positive diffuse large B-cell lymphomas of the elderly. *Adv Anat Pathol*. Sep 2011;18(5):349-355.
44. Gualco G, Natkunam Y, Bacchi CE. The spectrum of B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between diffuse large B-cell lymphoma and classical Hodgkin lymphoma: a description of 10 cases. *Mod Pathol*. May 2012;25(5):661-674.
45. Bosshart H. CD83 in Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *Pathology*. Oct 2002;34(5):479-481.
46. Cao W, Lee SH, Lu J. CD83 is preformed inside monocytes, macrophages and dendritic cells, but it is only stably expressed on activated dendritic cells. *Biochem J*. Jan 1 2005;385(Pt 1):85-93.
47. Chirala SS, Wakil SJ. Structure and function of animal fatty acid synthase. *Lipids*. Nov 2004;39(11):1045-1053.
48. Kant S, Kumar A, Singh SM. Fatty acid synthase inhibitor orlistat induces apoptosis in T cell lymphoma: role of cell survival regulatory molecules. *Biochim Biophys Acta*. Nov 2012;1820(11):1764-1773.
49. Oliveira JL, Grogg KL, Macon WR, Dogan A, Feldman AL. Clinicopathologic features of B-Cell lineage neoplasms with aberrant expression of CD3: a study of 21 cases. *Am J Surg Pathol*. Sep 2012;36(9):1364-1370.
50. Asano N, Oshiro A, Matsuo K, et al. Prognostic significance of T-cell or cytotoxic molecules phenotype in classical Hodgkin's lymphoma: a clinicopathologic study. *J Clin Oncol*. Oct 1 2006;24(28):4626-4633.
51. Kanavaros P, Vlychou M, Stefanaki K, et al. Cytotoxic protein expression in non-Hodgkin's lymphomas and Hodgkin's disease. *Anticancer Res*. Mar-Apr 1999;19(2A):1209-1216.
52. Parrens M, Vergier B, Fitoussi O, et al. Sequential development of Hodgkin's disease and CD30+ diffuse large B-cell lymphoma in a patient with MALT-type lymphoma: evidence of different clonal origin of single microdissected Reed-Sternberg cells. *Am J Surg Pathol*. Dec 2002;26(12):1634-1642.

Table 1. Clinicopathological features of previously reported cases of oral classic Hodgkin lymphoma.

Case	Authors	Age / gender	Localization	Histologic subtype	Treatment	Follow-up	IHC and ISH analysis
Oral cases							
1	Stern & Shensa (1973)	62/M*	Mandibular alveolar ridge	Reticulum-type	CT	DOD	NR
2	Peters et al. (1977)	77/F	Maxillary alveolus	MC	RT	NED at 3 years	NR
3	Bathard-Smith et al. (1978)	73/M	Upper buccal sulcus	MC	RT	NED at 9 months	NR
4	Cohen et al. (1984)	34/F*	Body of mandible	NR	CT	DOD	NR
5	Ronchi et al. (1988)	78/F*	Maxillary ridge	NR	CT	NED	NR
6	Lello et al. (1989)	51/F	Maxillary alveolus	NR	CT	NED at 1 year	NR
7	Mathews et al. (1989)	85/F*	Mandibular buccal vestibule	MC	RT, CT	DOD	NR
8	Papo et al. (1991)	24/M	Tongue	MC	RT, CT	NED at 13 months	NR
9	Tanaka et al. (1992)	55/M	Maxillary canine region	NR	CT	NED at 2 years	LCA+, MT1-, MB1-
10	Laskaris et al. (1992)	42M*	Retromolar mandibular region	NR	CT	NR	CD15+, LCA-, CD20-, CD45RO-, CD3-
11	Jamshed et al. (1997)	60/F	Mandibular buccal vestibule	NS	RT, CT	DOD	CD30-, CD15+, LCA-, CD20-, CD45RO-, S100-
12	Vigneswaran et al. (1997)	78/F*	Tongue	MC	CT	DOD	CD30+, CD15-, LCA-, CD20-, CD45RO-
13	Warburton et al. (2003)	37/F*	Body of mandible	NR	RT, CT	AWD	CD30+, CD15+, CD20-
14	Formatora et al. (2004) [Abstract]	70/F	Floor of the mouth	LP	NR	NED at 6 months	NR
15	Formatora et al. (2004) [Abstract]	32/M*	Palate	NR	NR	NR	NR
16	Whitt et al. (2007)	79/F	Palate	NR	RT	NED at 15 months	CD30+, CD15-, CD20+, CD45RO-
17	Gonzalez-Fontal et al. (2011)	68/M	Mandibular vestibule	NR	CT	NED	CD30+, CD15+, EBV+, LCA-, CD20-, EMA-, CD3-, CD4-, CD5-, CD8-
18	Darling et al. (2012)	71/M*	Mandibular buccal vestibule	NS	RT	NR	CD30+, CD15+, CD20-, CD5-, CD68-, CD1a-, S100-, CD10-, ALK1- EBER-
19	Kammerer et al. (2013)	73/M	Retromolar region	NR	RT, CT	DOD	CD30+, CD15+, CD20-, CD3-
20	Minicucci et al. (2013)	43/F	Palate	NR	CT	NED at 15 months	CD30+, CD15-, Fascina+, LCA-, CD56-, CD20-, CD3-, TIA1

M, male; F, female; *, previous history of nodal Hodgkin lymphoma; NS, nodular sclerosis; MC, mixed cellularity; LP, lymphocyte-predominant; RT, radiation therapy; CT, chemotherapy; NED, no evidence of disease; DOD, dead of disease, IHC, immunohistochemistry; ISH, in situ hybridization; LCA, leukocyte common antigen; ALK, anaplastic lymphoma kinase; LMP-1, latent membrane protein 1; EBV, Epstein-Barr virus; EBER1/2, EBV-encoded small nuclear RNA1/2; NR, not reported; ND, not done.

Table 2. Clinicopathological features of primary nodal HL in the current series.

<i>Case</i>	<i>Age / gender</i>	<i>Localization</i>	<i>HL type / Histologic subtype</i>
1	60/M	Cervical lymph node	cHL / NS
2	6/M	Submandibular region	cHL / NS
3	45/M	Supraclavicular lymph node	cHL / NS
4	58/M	Cervical and supraclavicular lymph nodes	cHL / MC
5	68/F	Cervical lymph node	cHL / MC
6	78/M	Cervical lymph node	cHL / NS
7	40/M	Submandibular region	cHL / MC
8	26/F	Supraclavicular lymph node	cHL / NS
9	44/F	Cervical lymph node	NLPHL

M, male; F, female; cHL, classical Hodgkin Lymphoma; NS, nodular sclerosis; MC, mixed cellularity; NLPHL, nodular lymphocyte predominant Hodgkin Lymphoma.

Table 3. Clinicopathological features of primary DLBCL presenting Hodgkin/Reed-Sternberg-like cells of the current series.

<i>Case</i>	<i>Age / gender</i>	<i>Localization</i>	<i>2008 WHO classification</i>	<i>Clinical presentation</i>
Oral cases				
1	78/F	Lower alveolar ridge	EBV+ DLBCL of the elderly (large cell subtype)	NR
2	83/F	Body of mandible	DLBCL, NOS (centroblastic variant)	Paresthesia ipsilateral
3	26/F	Cheek	DLBCL, NOS (unclassifiable)*	Ulceration
4	51/M	Upper posterior gingiva	DLBCL, NOS (unclassifiable)*	Purple tumor, destruction of adjacent bone
5	69/M	Tongue base	DLBCL, NOS (immunoblastic variant)	Ulcerated mass
6	59/M	Palate	DLBCL, NOS (immunoblastic variant)	Ulcerated tumor
7	80/F	Lower alveolar ridge	EBV+ DLBCL of the elderly (polymorphous subtype)	Painful ulcer
Extraoral cases				
8	26/F	Cervical lymph node	DLBCL, NOS (unclassifiable)*	Lymphadenopathy
9	22/M	Periorbital skin	DLBCL, NOS (immunoblastic variant)	NR

M, male; F, female; EBV, Epstein-Bar virus; DLBCL, diffuse large B-cell lymphoma; NOS, Not otherwise specified; NR, not reported; *, rare morphologic variant, including among other features myxoid stroma, signet ring cells, and isolated pleomorphic cells.

Table 4. Immunophenotypic and in situ hybridization features of HL and DLBCL-HRS of the current series.

Cases	2008 WHO Classification	CD30	CD15	LCA	LMP-1	EBER1/2	CD20	CD79a	PAX-5	FASN	CD83	CD45RO	CD3/CD43	MUM1/EMA	GranB/Perf	Ki-67 %	
Nodal HL cases / Subtype																	
1	eHL / NS	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-/+	-/+	-/-	15
2	eHL / NS	+	+	-	+	+	-	-	+/-	+	+	-	-/+	+/-	-/-	55	
3	eHL / NS	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-/-	-/-	-/-	29	
4	eHL / MC	+	+	-	+	+	-	-	+/-	+	+	-	-/-	+/-	-/-	62	
5	eHL / MC	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-/-	-/-	+/-	22	
6	eHL / NS	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-/-	-/-	-/-	60	
7	eHL / MC	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-/-	-/-	+/-	16	
8	eHL / NS	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-/-	+/-	-/-	80	
9	NLPHL	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-/-	-/+	-/-	60	
Oral DLBCL-HRS cases																	
1	EBV+ DLBCL of the elderly	+	-	+	-	+	-	+	+/-	+	+	-	-/+	+/-	-/+	65	
2	DLBCL, NOS	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-/-	+/-	-/-	37	
3	DLBCL, NOS	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-/+	+/-	-/-	32	
4	DLBCL, NOS	-	-	+	-	-	+	+	-	ND	ND	-	-/-	+/-	ND / ND	77	
5	DLBCL, NOS	-	-	+	-	-	+	+	ND	ND	ND	-	-/-	-/-	ND / ND	42	
6	DLBCL, NOS	-	-	+	-	-	+	+	ND	ND	ND	-	ND	ND / ND	- / ND	26	
7	EBV+ DLBCL of the elderly	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-/-	+/-	-/-	70	
Extracranial DLBCL-HRS cases																	
8	DLBCL, NOS	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-/+	+/-	ND / -	53	
9	DLBCL, NOS	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-/+	+/-	-/-	51	

cHL, classical Hodgkin lymphoma; NS, nodular sclerosis; MC, mixed cellularity; NLPHL, nodular lymphocyte predominant Hodgkin Lymphoma; EBV, Epstein-Bar virus; DLBCL, diffuse large B-cell lymphoma; NOS, not otherwise specified; DLBCL-HRS, DLBCL presenting Hodgkin/Reed-Sternberg-like cells; +/-, focal positivity; +, positive; -, negative; ND, not done, LCA, leucocyte common antigen; LMP-1, latent membrane protein 1; EBER 1/2, EBV-encoded small nuclear RNA1/2; PAX-5, B-cell specific activator protein; FASN, fatty acid synthase; MUM-1, multiple myeloma oncogene 1; EMA, epithelial membrane antigen; GranB, Granzyme B; Perf, perforin.

Table 5. Immunohistochemical and in situ hybridization features between nodal cHL and oral DLBCL-HRS cases of the current series.

Antibodies	cHL (n=8)	Oral DLBCL-HRS (n=7)
CD30 (%)	8/8 (100%)	4/7(57%)
CD15 (%)	7/8 (88%)	0/7(0%)
LCA (%)	0/8 (0%)	7/7(100%)
LMP-1 (%)	7/8 (88%)	2/7(29%)
EBER1/2 (%)	7/8 (88%)	3/7 (43%)
CD20 (%)	0/8 (0%)	6/7 (86%)
CD79a (%)	0/8 (0%)	7/7 (100%)
PAX-5 (%)	4/8 (50%)	4/5(80%)
FASN (%)	7/8 (88%)	4/4(100%)
MUM-1 (%)	4/8 (50%)	5/6(83%)
EMA (%)	0/8 (0%)	0/6(0%)
Granzyme B (%)	2/8 (25%)	0/5(0%)
Perforin (%)	0/8 (0%)	1/4(25%)

cHL, classical Hodgkin lymphoma; DLBCL-HRS, diffuse large B-cell lymphoma presenting Hodgkin/Reed-Sternberg-like cells, LCA, leucocyte common antigen; LMP-1, latent membrane protein 1; EBER 1/2, EBV-encoded small nuclear RNA1/2; PAX-5, B-cell specific activator protein; FASN, fatty acid synthase; MUM-1, multiple myeloma oncogene 1; EMA, epithelial membrane antigen.

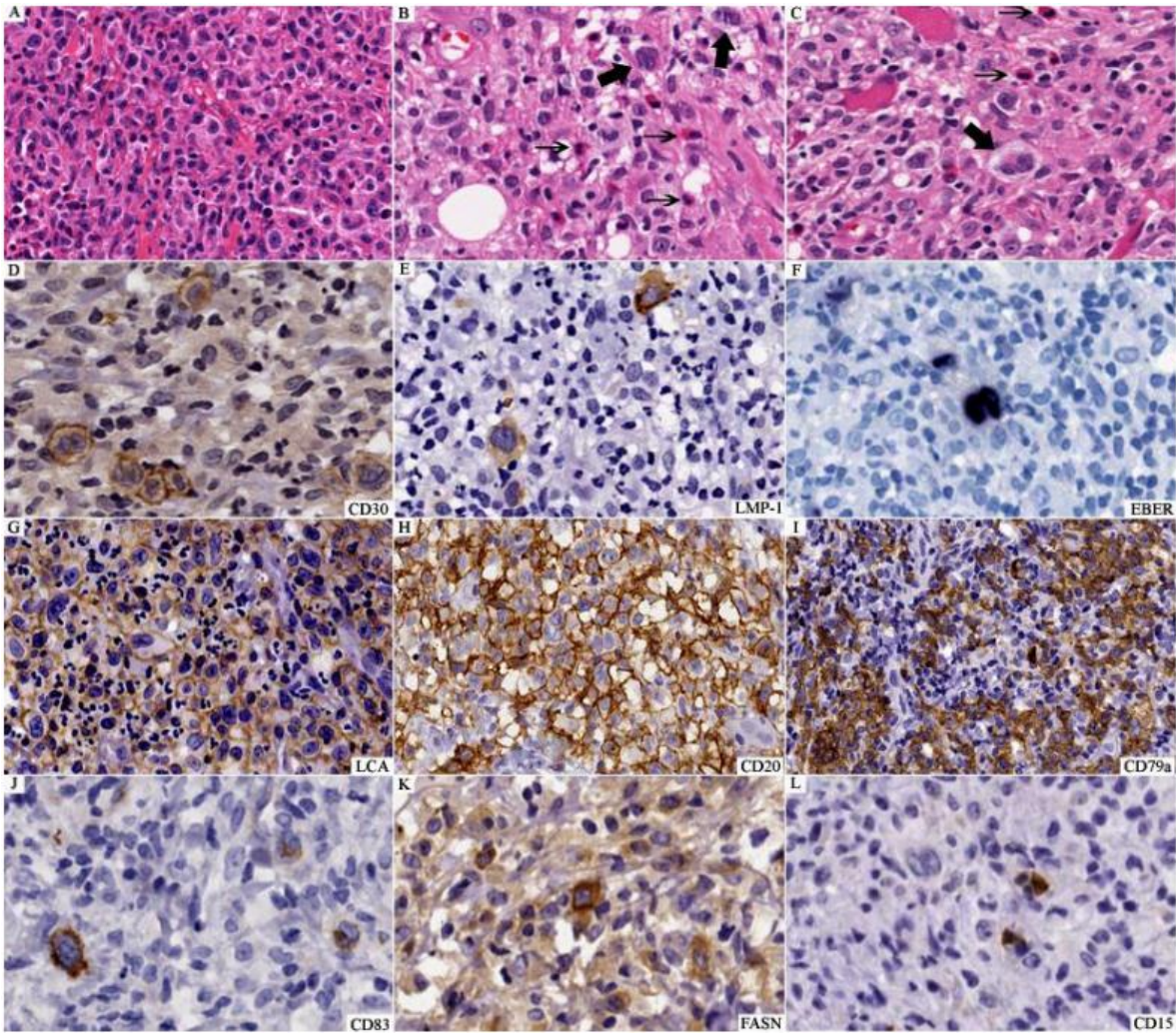


Figure 1. This oral case of DLBCL presenting Hodgkin/Reed-Sternberg-like cells showed a proliferation of large cells exhibiting predominant immunoblastic morphology. According to 2008 WHO classification, this case was classified as DLBCL, NOS (immunoblastic variant) (A, H&E stain, original magnification {OM} x200). HRS-like cells (large arrow) were observed admixed with eosinophils (thin arrow) and lymphocytes (B and C, H&E stain, OM x400). Immunohistochemical analysis showed strong positivity for CD30 (D, OM x400). Epstein-Barr virus infection was detected by both LMP-1 (E, x400) and in situ hybridization for EBER1/2 (F, OM x400). Cohesive sheets or small clusters of neoplastic large cells showed positivity for LCA (G, OM x400), CD20 (H, OM x400), and CD79a (I, OM x400). CD83 positivity in Golgi or cytoplasmic staining pattern was observed preferentially in large cells (J, OM x400). FASN immunorexpression was helpful to highlight isolated neoplastic cells admixed with inflammatory infiltrate (K, OM x400). Similar to other DLBCL cases, CD15 expression was negative, only control expression was observed (L, OM x400).

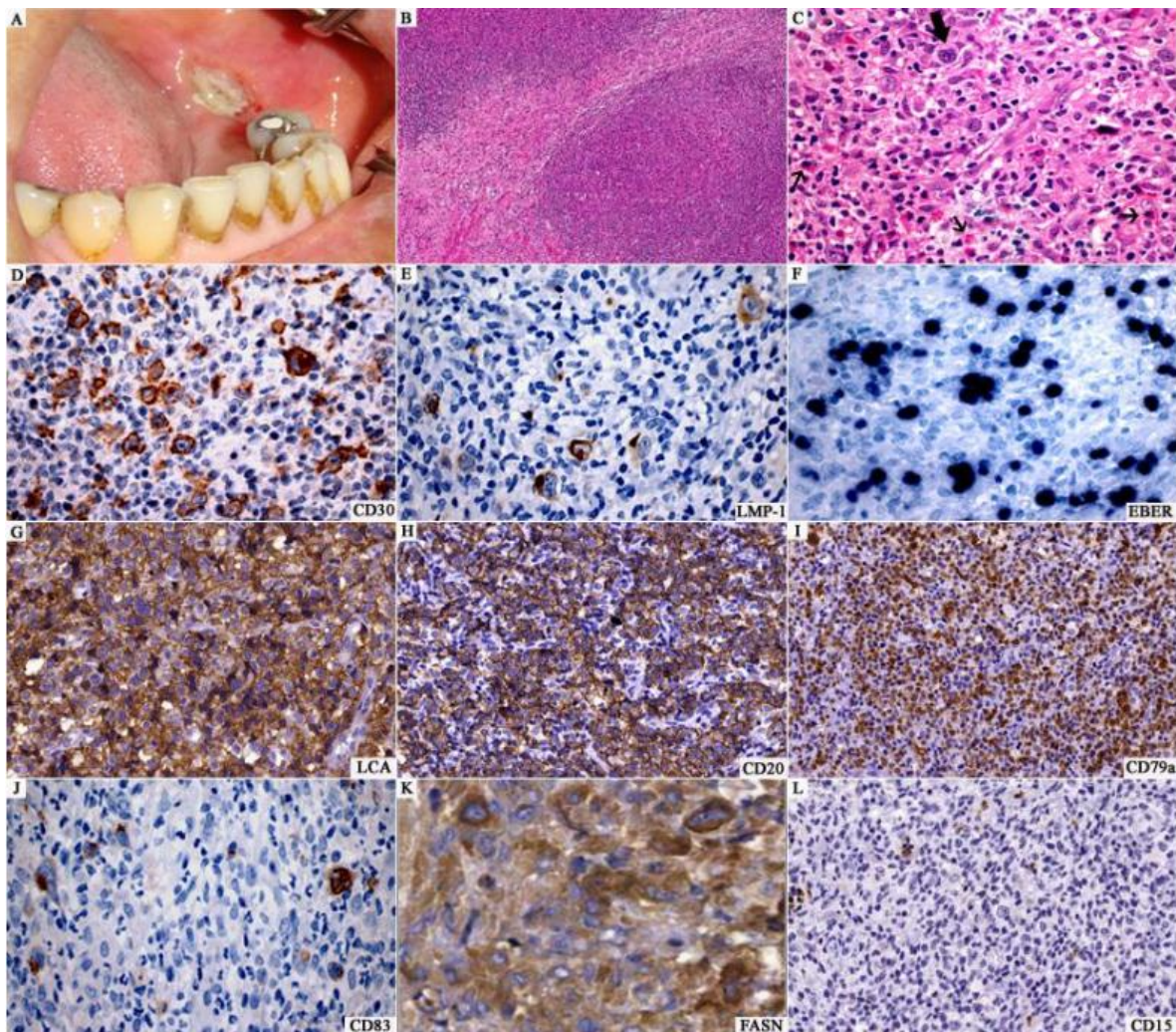


Figure 2. Clinical intraoral photograph of DLBCL with Hodgkin/Reed-Sternberg-like cells, showing ulceration area. According to 2008 WHO classification, this case was classified as EBV-positive DLBCL of the elderly (A). Microscopic analysis showed a proliferation lymphoid in nodular arrangement (B, H&E stain, original magnification {OM} x100). In high-power view, it was observed a cellular proliferation of heterogeneous cells as well as scattered large pleomorphic cells with Hodgkin/Reed-Sternberg-like (HRS-like) morphology (large arrow) surrounding by numerous inflammatory cells, including eosinophils (thin arrow) (C, H&E stain, OM x400). Immunohistochemical analysis showed strong positivity for CD30 in both membrane and Golgi staining pattern (D, OM x400), as well as immunoreactivity for LMP-1 in the HRS-like cells (E, OM x400). By in situ hybridization for EBER1/2, numerous cells, including HRS-like cells, showed strong positivity (F, OM x400). The large pleomorphic cells were positive for LCA (G, OM

x200), CD20 (H, OM x200), and CD79a (I, OM x200). CD83 in predominant Golgi staining pattern highlighted numerous large and HRS-like cells (J, OM x400). Sheets of neoplastic cells exhibited strong cytoplasmic positivity for FASN (K, OM x400). CD15 expression was negative, such as observed in all cases of DLCBL in the current series (L, OM x400).

CAPÍTULO 2¹

ORAL DIFFUSE LARGE B-CELL LYMPHOMA WITH HODGKIN/REED–STERNBERG-LIKE CELLS AND NODAL CLASSICAL HODGKIN LYMPHOMA: A COMPARATIVE STUDY OF ANGIOGENESIS AND MAST CELL INFILTRATION.

Victor Hugo Toral Rizo, DDS, PhD student,¹ Wilson Delgado Azañero, DDS, PhD,² Adalberto Mosqueda-Taylor, DDS, PhD,³ Oslei Paes Almeida, DDS, PhD,¹ Jorge Esquiche León, DDS, PhD.⁴

¹ Oral Pathology Section, Department of Oral Diagnosis, Piracicaba Dental School, University of Campinas-FOP/Unicamp, Piracicaba, São Paulo, Brazil.

² Department of Oral Medicine, Oral Surgery and Oral Pathology, Faculty of Dentistry, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Perú.

³ Department of Health Care, Universidad Autónoma Metropolitana, Xochimilco, México.

⁴ Oral Pathology, Department of Stomatology, Dentistry School of Ribeirão Preto, University of São Paulo (USP), Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil.

Running Title: Angiogenesis and mast cell in Hodgkin lymphoma and non-Hodgkin lymphoma.

Conflict of interest: No conflicts of interest to disclose.

Supported by: Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

***Corresponding author:** Dr. Jorge Esquiche León, Oral Pathology, Dental School of Ribeirão Preto, University of São Paulo. Av. do Café s/n Monte Alegre 14040-904 - Ribeirão Preto, SP - Brasil. E-mail:jleon@forp.usp.br; Tel: 0055-16-36024063; FAX: 0055-16-36024794.

¹ Este trabalho foi realizado no formato alternativo conforme Deliberação CCPG/002/06 da Comissão Central de Pós-Graduação (CCPG) da Universidade Estadual de Campinas.

Abstract

Background: The angiogenesis in Hodgkin's (HL) and non-Hodgkin's lymphoma (NHL) it is believed that is an important key for development, treatment and follow-up of patient's with this disease.

Objective: This study analyzed the angiogenesis and the index of mast cells in oral NHL and HL, evaluating the Micro vessels density (MVD), Micro vessels area (MVA), total vascular area (TVA) of the vessels and, mast cell density (MCD), with broad antibody panel.

Methods: We studied 15 cases of which, 8 cases of classical HL, and 7 cases of oral lymphoma 5 of these cases were classified as DLBCL, NOS, and 2 cases as EBV-positive DLBCL of the elderly with a broad angiogenic antibodies panel formed by: CD34, CD31, D2-40, CD105, vWF, VEGF, and Mast cell tryptase.

Results: An increased in MVD and TVA was observed between HL and ODLBCL being statistically significant. In HL cases, a correlation in MVD was observed between CD34/CD31/vWF and, in TVA was observed between CD34/CD31, and VEGF/ D2-40. In oral DLBCL-HRS-like cases, was observed correlations statistically significant in MVD, MVA and, TVA with CD34/CD31 and, CD34/vWF and CD31/ vWF and, CD105/D2-40 and, finally CD105/VEGF. Correlation in TVA existed among CD105, D2-40 and, D2-40/VEGF.

Conclusion: Angiogenesis is essential to the development of hematolymphoid neoplasms, in this study observed an increase in angiogenesis, as well as in LH and in oral DLBCL. The Evaluation of angiogenesis with morphometric parameters, can be performed through either of the antibodies; CD34, CD31 and vWF. The increased mast cells and the location next to vascular structures in these lesions suggest participation in the process of angiogenesis. The variable results in the literature increases the importance of exploring further correlations among MVD, MVA, TVA, and MCD in LH and DLBCL of the oral cavity.

Key-Words: Hodgkin lymphoma; oral cavity; diffuse large B-cell lymphoma; Hodgkin/Reed-Sternberg-like cells; angiogenesis.

Introduction

Angiogenesis is the development of new blood vessels from preexisting vasculature, a fundamental process to tumor growth (Poon *et al.* 2001, Carmeliet 2005). The research of the literature has demonstrated the important role of angiogenesis in cancer (Weidner 1995, Poon *et al.* 2001, Koster *et al.* 2005, Fang *et al.* 2011), and has shown that angiogenesis is an important key in hematologic malignancies of both myeloid and lymphoid origin (Mangi *et al.* 2000, Koster and Raemaekers 2005, Medinger *et al.* 2010). The formation of new blood vessels, is regulated by proangiogenic and antiangiogenic molecules in physiologic conditions and the most prominent of these factors is vascular endothelial growth factor (VEGF)-A. This appears in four isoforms: VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉, and VEGF₂₀₆. VEGF-A activity is mediated by VEGF receptor (VEGFR)-1 (Flt-1), expressed on endothelial cells as well as on hematopoietic stem cells and several other cell types. The expression of VEGF is mainly stimulated by hypoxia through the hypoxia-inducible factor-1 pathway, and induced by several cytokines such as platelet-derived growth factor, fibroblast growth factor, tumor necrosis factor α , others as well as by oncogenes like p53, Ras, c-Myc, Bcl-2 and others (Ferrara *et al.* 2003, Podar *et al.* 2005, Liersch *et al.* 2008).

One parameter of angiogenesis in lymphoma is the microvessel density (MVD) in which samples are immunohistochemically stained with endothelial cell marker (anti-FVIII, anti-CD31, anti-CD34) and vessels are accounted to perform this analysis (Koster and Raemaekers 2005, Cardesa-Salzmann *et al.* 2011, Aggarwal *et al.* 2012). In samples of malignant lymphoma, the MVD is significantly higher than in reactive lymph nodes. In the same way, MVD is higher in aggressive lymphomas than in low-grade lymphomas (Vacca *et al.* 1999, Koster and Raemaekers 2005, Cardesa-Salzmann *et al.* 2011, Kopic *et al.* 2011). In Hodgkin's lymphoma there are few reports of angiogenesis studies; and was reported the expression of vascular endothelial growth factor angiogenic factor by the HRS cells (Doussis-Anagnostopoulou *et al.* 2002, Passam *et al.* 2009). Korkolopoulou *et al.* in 2005 (Korkolopoulou *et al.* 2005), reported that the maximum level of microvessels formation coincides with the early stages(I-II) of HL and that progression in stage (III-IV) is accompanied by qualitative, rather than quantitative, alterations in microvascular network. Emphasizing that, microvascular network provides independent prognostic

information on HL, requiring the concomitant evaluation of the vascular density and morphology of the microvessels. Researchers have reported poor prognosis when many mast cells are found in the Hodgkin's lymphoma (Molin *et al.* 2002) and this same group of researchers in 2005 (Glimelius *et al.* 2005) published the association of angiogenesis and mast cells in HL. Researchers had investigated the role of angiogenesis in non-Hodgkin B-cell lymphomas and the results show higher MVD in these types of lymphomas (Vacca *et al.* 1999, Mangi and Newland 2000, Cardesa-Salzmann *et al.* 2011, Aggarwal *et al.* 2012). In the present study, we analyzed by the first time the morphometric parameters (MVD, MVA, TVA), as well as the index of mast cells in cases of oral DLBCL and compare them with Hodgkin lymphoma using a broad immunohistochemical panel of angiogenesis markers.

Materials and methods

This research was previously approved by the ethical committee in human research of State University of Campinas (036/2012). All cases used in this work were classified according to the 2008 World Health Organization (WHO) classification of tumors of haematopoietic and lymphoid tissues (Swerdlow *et al.* 2008). Were screened 30 cases of which, eight cases corresponded to cHL, the most involved the cervical lymph nodes. Seven cases corresponded to oral DLBCL-HRS (5 cases were classified as DLBCL, not otherwise specified [DLBCL, NOS], and 2 cases as EBV-positive DLBCL of the elderly) (**Tables 1 and 2**).

Primary nodal cHL patients comprised 6 males and 2 females, with a median age of 47 years. Five and 3 cases of cHL were classified as nodular sclerosis and mixed cellularity subtypes, respectively (**Table 1**). Primary oral DLBCL-HRS patients comprised 4 females and 3 males, with a mean age of 70 years. Seven out of 9 cases involved the mouth, 4 the alveolar ridge and cheek, tongue and palate with one case each (**Table 2**).

All biopsies were fixed in 10% formalin, embedded in paraffin, and 3- μ m sections mounted in 3-aminopropyltriethoxysilane slides were used for H&E staining (**Fig. 1**) and immunohistochemistry.

In order to evaluate the vascular stroma in these lymphoid neoplasms, we used the following monoclonal antibodies: CD31 (1C70A), CD34 (QBEnd), CD105 (SNGH), D2-40 (D2-40), von Willebrand factor (vWF) (F8/86), and VEGF (VG1). Furthermore, to evaluate the presence of mast cells and its relationship with vascular markers was used mast cell tryptase (AA1). For immunohistochemistry the slides were hydrated and treated with hydrogen peroxide (3%), antigen retrieval was done with the help of pressure cooker using sodium citrate buffer (pH6). Incubation overnight with the primary antibody was followed by the secondary antibody conjugated with streptavidin-biotin-peroxidase (Kit LSAB, DAKO, Carpinteria, CA, USA), development with diaminobenzidine and counterstaining with Carazzi's hematoxylin.

The slides were scanned and photographed by Aperio ScanScope (Aperio Technologies[®], Vista California, USA) device. MVD, MVA, and TVA were established identifying the most vascularized areas within the lesions ("hot spots") which were chosen at low magnification (x100), and subsequently photographed in ten fields at x200 magnification. The pictures were performed using the Aperio ScanScope[®] software. The measurement of vessel area was accomplished by vascular contour tracing using the Image J[®] software (Scion Corporation, USA), which measured automatically the analyzed area (μm^2). Single endothelial cells or cluster of endothelial cells, with or without a lumen, were considered to be individual vessels. Thus, MVD was calculated as the mean number of vessels in a x200 field, TVA, was calculated as the total area of vessels in all fields assessed, and MVA was calculated as the mean area by vessel in a x200 field. To assess mast cell tryptase expression were selected areas with highest number of immunostained cells (at x100 magnification), and ten fields at x200 magnification of each slide were photographed. The total number of mast cells positive (MCD) for tryptase in both lymphomas were counted in each field at x200 magnification using the software Image J[®], and then the average percentages of the immunostained cells were calculated in each case (Weidner *et al.* 1991, Aguayo *et al.* 2000, de Lima *et al.* 2013).

The data collected was typed and organized in database, using *Statistical Package for Social Science* (SPSS) software, version 17.0. First, descriptive analysis was carried out and subsequently, the continuous variables were subjected to normality test *Shapiro-Wilk*.

The t test for independent samples and *Mann-Whitney* test were used to compare MVD, MVA, TVA, and tryptase-positive mast cell infiltration. In addition, Pearson's and Spearman's correlation tests were performed to continuous variables. A probability (*P*) value less than 0.05 was considered statistically significant.

Results

An increased in MVD and TVA was observed between HL and ODLBCL being statistically significant in all antibodies ($p < 0.001$) (**Table 3**). However, the MVA only was statistically significant with CD34 ($p = 0.08$), CD31 ($p = 0.04$), CD105 ($p = 0.001$), and D2-40 ($p = 0.001$) (**Table 3**).

In HL cases, positive correlations in MVD emerged between CD34/CD31 and, CD34/vWF and, CD31/vWF ($r = 0.976$, $p = 0.0003$) (**Fig. 1**). A negative correlation in MVD emerged between CD105 and D2-40 ($r = -0.714$, $p = 0.046$) (**Fig. 2**). The positive correlation was observed in TVA, between CD34, CD31 ($r = 0.785$, $p = 0.02$), and VEGF and D2-40 ($r = 0.714$, $p = 0.04$). MVA did not show statistical significance.

In the group of oral DLBCL-HRS-like, we observed positive correlations in MVD, MVA and, TVA with CD34/CD31; CD34/vWF; CD31/vWF ($r = 0.918$, $p = 0.003$; $r = 0.964$, $p = 0.0004$ and, $r = 0.892$, $p = 0.0006$ respectively); CD105/D2-40 ($r = 0.0964$, $p = 0.0004$); and finally CD105/VEGF ($r = 0.928$, $p = 0.002$). Positive correlation in TVA existed between CD105/D2-40 ($r = 0.964$, $p = 0.0004$) and; D2-40/VEGF ($r = 0.785$, $p = 0.03$) (**Fig. 1 and 2**).

Discussion

This study shows the analysis by the first time of MVD, MVA, TVA and, MCD between HL and oral DLBCL with broad IHC panel. In our study, HL in lymph nodes region had higher MVD than extra-lymphatic B-NHL lesions. The use of any of this antibody panel CD34, CD31 and, vWF to evaluate microvascular parameters are recommended, since all three showed similar values in both groups analyzed. The anti-body vWF is very specific for endothelial cells, although it may not highlight all intratumor microvessels. Additionally, despite it's apparently more sensitive, CD31 strongly cross-reacts with plasma cells. CD34 is an acceptable alternative and the most reproducible endothelial cell highlighter in many laboratories, but CD34 will highlight perivascular

stromal cells and has been noted to stain a wide variety of stromal neoplasms. (Weidner 1995, Padro *et al.* 2000, Taskinen *et al.* 2010). Some studies showed that maximum level of microvessel formation coincides with early stage of HL and, the progression is accompanied by qualitative rather than, quantitative, alterations in the microvascular network (Citak *et al.* 2008). Regarding HL, studies have reported that the value of MVD decreases with stage progression and increasing number of involved anatomic sites (Korkolopoulou *et al.* 2005). There are controversial in this point because Mainou-Fowler *et al.* (Mainou-Fowler *et al.* 2006) and Glimelius *et al.* (Glimelius *et al.* 2005) reported the association of increase in MVD with disease progression.

In many solid tumors and some hematological malignancies, the MVD expression defines the angiogenic stage and risk of progression (Weidner 1995, Vermeulen *et al.* 1996, Passam *et al.* 2009, Cardesa-Salzmann *et al.* 2011, Aggarwal *et al.* 2012). To Passam *et al.* (Passam *et al.* 2009) the interpretation of MVD in HL cannot be easily interpreted, whereby it is controversial if the MVD is a prognostic factor in cases of HL.

As for NHL, researchers have showed that MVD increase in aggressive subtypes and lower in indolent lymphomas (Koster and Raemaekers 2005, Gratzinger *et al.* 2010, Kopic *et al.* 2011, Aggarwal *et al.* 2012). This study is the first to analyze angiogenesis in intra-oral lymphoma cases. Unfortunately was not possible to assess whether there is an association with the progression of disease. However, the MVD in our cases is clearly higher (mean 10.06 ± 0.70), when we compare the values of MVD in the study of Mostasham *et al.* 2010 (Mohtasham *et al.* 2010), which analyzed normal oral mucosa (mean 5.5 ± 2.5). In this same study, the results obtained for dysplastic oral mucosa (mean 8.3 ± 1.7) and oral squamous cell carcinoma lesions (mean 11.6 ± 3.1) were similar to ours in ODLBCL. Specifically for DLBCL has been provided increasing evidence that angiogenesis plays a role in the biology of this entity (Ganjoo *et al.* 2008, Gratzinger *et al.* 2008, Negaard *et al.* 2009, Gratzinger *et al.* 2010, Mezei *et al.* 2012). Therefore the increased of MVD has also been described as a negative factor in solid tumors (Mucci *et al.* 2009), as well as in NHL (Arias *et al.* 2000, Koster and Raemaekers 2005, Tzankov *et al.* 2007, Medinger *et al.* 2010) specifically, in DLBCL cases (Ribatti *et al.* 1996, Cardesa-Salzmann *et al.* 2011, Aggarwal *et al.* 2012). In this study although we could not assessed

the association of TVA and disease progression. It was clear the increase in TVA, in both of our analyzed groups. This increased support the notion that the larger the lumen of microvessels the higher the chance of neoplastic cells to have access into the circulation, spreading and colonizing target organs (Folkman *et al.* 1992, Pavlopoulos *et al.* 1998, Korkolopoulou *et al.* 2005, Kopic *et al.* 2011).

We observed that in all cases including HL and oral DLBCL, although in variable proportion, had a co-localization of MC with all vascular antibodies. Our results are consistent with findings in the literature, where the suggestion that tryptase-positive MCs may contribute, at least in part to the angiogenesis in B-NHLs (Ribatti *et al.* 2000, Molin *et al.* 2002, Ribatti *et al.* 2004, Reiners *et al.* 2009, Duse *et al.* 2011). The clinical prognosis has been correlated in haematological tumours with MCs density and MVD (Ribatti *et al.* 2012). In benign lymphadenopathies and B cell NHL, angiogenesis correlates with total and tryptase-positive MC counts, and increases sequentially with the increase of malignancy grades (Ribatti *et al.* 1998, Ribatti *et al.* 2000). Conversely, Glimelius *et al.* (Glimelius *et al.* 2005) reported lack of correlation between high MVD and mast cell, suggesting a different pathway for the proliferation of microvessels in HL and, moreover, the increase of MVD is important for the prognosis in HL even without correlation to mast cell.

This work showed that CD105 (endoglin) was highly expressed by endothelial cells of intratumoral vessels, showing the increase of new vessels in both entities. Tumor vessels specifically express CD105 (endoglin), and this are useful to discriminate between normal and tumor vessels, because this antibody is positive in new vessels, discriminating against preexisting blood vessels (Duse *et al.* 2012). Differential high counting of mature and immature tumor blood vessels by using CD34 and CD105 can be associated with the degree of metastasis from NHL because of their higher potential to favor passing the tumor cells into bloodstream and subsequent tumor spreading. Metastasis experimental models described CD105 involvement in lung metastasis from breast cancer (Duse *et al.* 2012, Hong *et al.* 2012). Higher sensitivity is found in use of CD105 for differential counting of tumor blood vessels and can show better angiogenic status of NHL. These aspects were described for other tumor types with impact on probable therapeutic approach (Eshghyar *et al.* 2011, Duse *et al.* 2012, Pirtea *et al.* 2012, Smith *et al.* 2012).

Lymphangiogenesis has been demonstrated in various pathological processes such as malignant neoplasms. Kadowaki et al. (Kadowaki *et al.* 2005) evaluated the lymphangiogenesis and in 44 lymph nodes of 39 malignant lymphomas and five non-reactive normal lymph nodes, based on the lymphatic vessel density (LVD). The LVD of malignant lymphomas in this study was significantly higher than that of non-reactive normal lymph nodes, irrespective of subtypes (normal lymph nodes, mean 1.4 ± 0.75 ; HL, mean 9.7 ± 4.6 ; DLBCL, mean 8.04 ± 5.8). Our study analyzed the LVD with podoplanin (D2-40) and was obtained similar values in nodal cases. These findings suggest that lymphangiogenesis is actively developed in lymph nodes of malignant lymphomas (Kadowaki *et al.* 2005, Martelli *et al.* 2013). Wróel et al. (Wroel *et al.* 2006) evaluated the lymphatic sinus density (LSD) in lymph node, using the antibody LYVE-1 (lymphatic endothelium hyaluronan receptor) and VEGF-C expression in patients with non-Hodgkin's lymphoma (NHL) and in reactive lymph nodes. The mean LSD in reactive lymph nodes was higher than in NHL ($p=0.03$). NHLs are not associated with increased expression of VEGF-C or with increased LYVE-1-positive in lymphatic sinuses. Increased of LSD in reactive lymph nodes as compared to those of NHL patients suggests that, lymphoma proliferation leads to the destruction of the existing lymphatics, rather than stimulate the lymphangiogenesis within lymph nodes (Ma *et al.* 2012). Was investigated in 75 patients diagnosed with NHL, if there was correlations between lymphangiogenesis, cyclooxygenase (COX)-2 and vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C) in non-Hodgkin's lymphoma (NHL) and their associations with the clinical parameters of patients. They suggest that lymphangiogenesis is correlated with aggressive histology in NHL and both COX-2 and VEGF-C are inducers of lymphangiogenesis and their expression levels are correlated in NHL.

Conclusion

Angiogenesis is essential to the development of hematolymphoid neoplasms, in this study observed an increase in angiogenesis, as well as in LH and in oral DLBCL. The Evaluation of angiogenesis with morphometric parameters, can be performed through either of the antibodies; CD34, CD31 and vWF. The increased mast cells and the location next to

vascular structures in these lesions suggest participation in the process of angiogenesis. The variable results in the literature increases the importance of exploring further correlations among MVD, MVA, TVA, and MCD in LH and DLBCL of the oral cavity.

References

1. Aggarwal D, Srivastava G, Gupta R, Pant L, Krishan G, Singh S. Angiogenesis in Non-Hodgkin's Lymphoma: An Intercategory Comparison of Microvessel Density. *ISRN Hematol.* 2012;2012:943089.
2. Aguayo A, O'Brien S, Keating M, Manshoury T, Gidel C, Barlogie B, et al. Clinical relevance of intracellular vascular endothelial growth factor levels in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2000 Jul 15;96(2):768-70.
3. Arias V, Soares FA. Vascular density (tumor angiogenesis) in non-Hodgkin's lymphomas and florid follicular hyperplasia: a morphometric study. *Leuk Lymphoma.* 2000 Dec;40(1-2):157-66.
4. Cardesa-Salzman TM, Colomo L, Gutierrez G, Chan WC, Weisenburger D, Climent F, et al. High microvessel density determines a poor outcome in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab plus chemotherapy. *Haematologica.* 2011 Jul;96(7):996-1001.
5. Carmeliet P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature.* 2005 Dec 15;438(7070):932-6.
6. Citak EC, Oguz A, Karadeniz C, Akyurek N. Immunohistochemical expression of angiogenic cytokines in childhood Hodgkin lymphoma. *Pathol Res Pract.* 2008;204(2):89-96.
7. de Lima VC, de Carvalho AF, Morato-Marques M, Hashimoto VL, Spilborghs GM, Marques SM, et al. TNF-alpha and melphalan modulate a specific group of early expressed genes in a murine melanoma model. *Cytokine.* 2013 May;62(2):217-25.
8. Doussis-Anagnostopoulou IA, Talks KL, Turley H, Debnam P, Tan DC, Mariatos G, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is expressed by neoplastic Hodgkin-Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease. *J Pathol.* 2002 Aug;197(5):677-83.
9. Duse AO, Ceausu RA, Cimpean AM, Ionita H, Raica M, Gaje P. Heterogeneity of malignant non-Hodgkin lymphoma-associated blood vessels. *Rom J Morphol Embryol.* 2012;53(4):985-8.
10. Duse AO, Ceausu RA, Mezei T, Cimpean AM, Gaje P, Ionita H, et al. Mast cells contribute to the angiogenesis in non-Hodgkin lymphoma. An immunohistochemical study based on the relationship with microvessel density. *Rom J Morphol Embryol.* 2011;52(3 Suppl):1091-6.
11. Eshghyar N, Mohammadi N, Rahrotaban S, Motahhary P, Vahedi Vaez SM. Endoglin (CD105) positive microvessel density and its relationship with lymph node metastasis in squamous cell carcinoma of the tongue. *Arch Iran Med.* 2011 Jul;14(4):276-80.
12. Fang S, Repo H, Joensuu H, Orpana A, Salven P. High serum angiogenin at diagnosis predicts for failure on long-term treatment response and for poor overall survival in non-Hodgkin lymphoma. *Eur J Cancer.* 2011 Jul;47(11):1708-16.

13. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*. 2003 Jun;9(6):669-76.
14. Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. *J Biol Chem*. 1992 Jun 5;267(16):10931-4.
15. Ganjoo KN, Moore AM, Orazi A, Sen JA, Johnson CS, An CS. The importance of angiogenesis markers in the outcome of patients with diffuse large B cell lymphoma: a retrospective study of 97 patients. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2008 Mar;134(3):381-7.
16. Glimelius I, Edstrom A, Fischer M, Nilsson G, Sundstrom C, Molin D, et al. Angiogenesis and mast cells in Hodgkin lymphoma. *Leukemia*. 2005 Dec;19(12):2360-2.
17. Gratzinger D, Advani R, Zhao S, Talreja N, Tibshirani RJ, Shyam R, et al. Lymphoma cell VEGFR2 expression detected by immunohistochemistry predicts poor overall survival in diffuse large B cell lymphoma treated with immunochemotherapy (R-CHOP). *Br J Haematol*. 2010 Jan;148(2):235-44.
18. Gratzinger D, Zhao S, Tibshirani RJ, Hsi ED, Hans CP, Pohlman B, et al. Prognostic significance of VEGF, VEGF receptors, and microvessel density in diffuse large B cell lymphoma treated with anthracycline-based chemotherapy. *Lab Invest*. 2008 Jan;88(1):38-47.
19. Hong H, Zhang Y, Severin GW, Yang Y, Engle JW, Niu G, et al. Multimodality Imaging of Breast Cancer Experimental Lung Metastasis with Bioluminescence and a Monoclonal Antibody Dual-Labeled with (89)Zr and IRDye 800CW. *Mol Pharm*. 2012 Jul 19.
20. Hussong JW, Rodgers GM, Shami PJ. Evidence of increased angiogenesis in patients with acute myeloid leukemia. *Blood*. 2000 Jan 1;95(1):309-13.
21. Kadowaki I, Ichinohasama R, Harigae H, Ishizawa K, Okitsu Y, Kameoka J, et al. Accelerated lymphangiogenesis in malignant lymphoma: possible role of VEGF-A and VEGF-C. *Br J Haematol*. 2005 Sep;130(6):869-77.
22. Kopic E, Cickusic E, Kopic A, Arnautovic-Custovic A, Halilbasic A, Tinjic L, et al. Morphometric angiogenesis parameters for indolent and aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Med Arh*. 2011;65(1):9-12.
23. Korkolopoulou P, Thymara I, Kavantzias N, Vassilakopoulos TP, Angelopoulou MK, Kokoris SI, et al. Angiogenesis in Hodgkin's lymphoma: a morphometric approach in 286 patients with prognostic implications. *Leukemia*. 2005 Jun;19(6):894-900.
24. Koster A, Raemaekers JM. Angiogenesis in malignant lymphoma. *Curr Opin Oncol*. 2005 Nov;17(6):611-6.
25. Liersch R, Schliemann C, Bieker R, Hintelmann H, Buechner T, Berdel WE, et al. Expression of VEGF-C and its receptor VEGFR-3 in the bone marrow of patients with acute myeloid leukaemia. *Leuk Res*. 2008 Jun;32(6):954-61.
26. Ma SP, Lin M, Liu HN, Yu JX. Lymphangiogenesis in non-Hodgkin's lymphoma and its correlation with cyclooxygenase-2 and vascular endothelial growth factor-C. *Oncol Lett*. 2012 Oct;4(4):695-700.
27. Mainou-Fowler T, Angus B, Miller S, Proctor SJ, Taylor PR, Wood KM. Micro-vessel density and the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and platelet-derived endothelial cell growth factor (PdeGF) in classical Hodgkin lymphoma (HL). *Leuk Lymphoma*. 2006 Feb;47(2):223-30.
28. Mangi MH, Newland AC. Angiogenesis and angiogenic mediators in haematological malignancies. *Br J Haematol*. 2000 Oct;111(1):43-51.

29. Martelli M, Ferreri AJ, Agostinelli C, Di Rocco A, Pfreundschuh M, Pileri SA. Diffuse large B-cell lymphoma. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2013 Jan 30.
30. Medinger M, Fischer N, Tzankov A. Vascular endothelial growth factor-related pathways in hemato-lymphoid malignancies. *J Oncol*. 2010;2010:729725.
31. Mezei T, Horvath E, Turcu M, Gurzu S, Raica M, Jung I. Microvascular density in non-Hodgkin B-cell lymphomas measured using digital morphometry. *Rom J Morphol Embryol*. 2012;53(1):67-71.
32. Mohtasham N, Babakoochi S, Salehinejad J, Montaser-Kouhsari L, Shakeri MT, Shojaee S, et al. Mast cell density and angiogenesis in oral dysplastic epithelium and low- and high-grade oral squamous cell carcinoma. *Acta Odontol Scand*. 2010 Sep;68(5):300-4.
33. Molin D, Edstrom A, Glimelius I, Glimelius B, Nilsson G, Sundstrom C, et al. Mast cell infiltration correlates with poor prognosis in Hodgkin's lymphoma. *Br J Haematol*. 2002 Oct;119(1):122-4.
34. Mucci LA, Powolny A, Giovannucci E, Liao Z, Kenfield SA, Shen R, et al. Prospective study of prostate tumor angiogenesis and cancer-specific mortality in the health professionals follow-up study. *J Clin Oncol*. 2009 Nov 20;27(33):5627-33.
35. Negaard HF, Iversen N, Bowitz-Lothe IM, Sandset PM, Steinsvik B, Ostenstad B, et al. Increased bone marrow microvascular density in haematological malignancies is associated with differential regulation of angiogenic factors. *Leukemia*. 2009 Jan;23(1):162-9.
36. Padro T, Ruiz S, Bieker R, Burger H, Steins M, Kienast J, et al. Increased angiogenesis in the bone marrow of patients with acute myeloid leukemia. *Blood*. 2000 Apr 15;95(8):2637-44.
37. Passam FH, Alexandrakis MG, Kafousi M, Fotinou M, Darivianaki K, Tsirakis G, et al. Histological expression of angiogenic factors: VEGF, PDGFRalpha, and HIF-1alpha in Hodgkin lymphoma. *Pathol Res Pract*. 2009;205(1):11-20.
38. Pavlopoulos PM, Konstantinidou AE, Agapitos E, Kavantzias N, Nikolopoulou P, Davaris P. A morphometric study of neovascularization in colorectal carcinoma. *Cancer*. 1998 Nov 15;83(10):2067-75.
39. Pirtea L, Raica M, Cimpean AM. Endothelial cell activation and proliferation in ovarian tumors: two distinct steps as potential markers for antiangiogenic therapy response. *Mol Med Rep*. 2012 May;5(5):1181-4.
40. Podar K, Anderson KC. The pathophysiologic role of VEGF in hematologic malignancies: therapeutic implications. *Blood*. 2005 Feb 15;105(4):1383-95.
41. Poon RT, Fan ST, Wong J. Clinical implications of circulating angiogenic factors in cancer patients. *J Clin Oncol*. 2001 Feb 15;19(4):1207-25.
42. Reiners KS, Gossmann A, von Strandmann EP, Boll B, Engert A, Borchmann P. Effects of the anti-VEGF monoclonal antibody bevacizumab in a preclinical model and in patients with refractory and multiple relapsed Hodgkin lymphoma. *J Immunother*. 2009 Jun;32(5):508-12.
43. Ribatti D, Crivellato E. Mast cells, angiogenesis, and tumour growth. *Biochim Biophys Acta*. 2012 Jan;1822(1):2-8.
44. Ribatti D, Crivellato E, Roccaro AM, Ria R, Vacca A. Mast cell contribution to angiogenesis related to tumour progression. *Clin Exp Allergy*. 2004 Nov;34(11):1660-4.

45. Ribatti D, Nico B, Vacca A, Marzullo A, Calvi N, Roncali L, et al. Do mast cells help to induce angiogenesis in B-cell non-Hodgkin's lymphomas? *Br J Cancer*. 1998 Jun;77(11):1900-6.
46. Ribatti D, Vacca A, Marzullo A, Nico B, Ria R, Roncali L, et al. Angiogenesis and mast cell density with tryptase activity increase simultaneously with pathological progression in B-cell non-Hodgkin's lymphomas. *Int J Cancer*. 2000 Jan 15;85(2):171-5.
47. Ribatti D, Vacca A, Nico B, Fanelli M, Roncali L, Dammacco F. Angiogenesis spectrum in the stroma of B-cell non-Hodgkin's lymphomas. An immunohistochemical and ultrastructural study. *Eur J Haematol*. 1996 Jan-Feb;56(1-2):45-53.
48. Smith SJ, Tilly H, Ward JH, Macarthur DC, Lowe J, Coyle B, et al. CD105 (Endoglin) exerts prognostic effects via its role in the microvascular niche of paediatric high grade glioma. *Acta Neuropathol*. 2012 Jul;124(1):99-110.
49. Swerdlow SH, Jaffe E, Pileri A, Stein H, al. e. WHO Classification of tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Fourth ed. ed. IARC, editor. Lyon, France: IARC; 2008.
50. Taskinen M, Jantunen E, Kosma VM, Bono P, Karjalainen-Lindsberg ML, Leppa S. Prognostic impact of CD31-positive microvessel density in follicular lymphoma patients treated with immunochemotherapy. *Eur J Cancer*. 2010 Sep;46(13):2506-12.
51. Tzankov A, Heiss S, Ebner S, Sterlacci W, Schaefer G, Augustin F, et al. Angiogenesis in nodal B cell lymphomas: a high throughput study. *J Clin Pathol*. 2007 May;60(5):476-82.
52. Vacca A, Ribatti D, Ruco L, Giacchetta F, Nico B, Quondamatteo F, et al. Angiogenesis extent and macrophage density increase simultaneously with pathological progression in B-cell non-Hodgkin's lymphomas. *Br J Cancer*. 1999 Feb;79(5-6):965-70.
53. Vermeulen PB, Gasparini G, Fox SB, Toi M, Martin L, McCulloch P, et al. Quantification of angiogenesis in solid human tumours: an international consensus on the methodology and criteria of evaluation. *Eur J Cancer*. 1996 Dec;32A(14):2474-84.
54. Weidner N. Intratumor microvessel density as a prognostic factor in cancer. *Am J Pathol*. 1995 Jul;147(1):9-19.
55. Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med*. 1991 Jan 3;324(1):1-8.
56. Wroel T, Mazur G, Dziegiel P, Jelen M, Szuba A, Kuliczowski K, et al. Density of intranodal lymphatics and VEGF-C expression in B-cell lymphoma and reactive lymph nodes. *Folia Histochem Cytobiol*. 2006;44(1):43-7.

Table 1 Clinical features of primary Hodgkin lymphoma

<i>Case</i>	<i>Age / gender</i>	<i>Localization</i>	<i>Histologic type</i>
1	60 / M	Left cervical lymph node	cHL / NS
2	6 / M	Left Submandibular	cHL / NS
3	45 / M	Left supraclavicular Lymph node	cHL / NS
4	58 / M	Right cervical and supraclavicular lymph node	cHL / MC
5	68 / F	Cervical lymph node	cHL / MC
6	78 / M	Neck	cHL / NS
7	40 /M	Submandibular	cHL / MC
8	26 /F	Left supraclavicular Lymph node	cHL / NS

M, male; F, female; cHL, classical Hodgkin Lymphoma; NS, nodular sclerosis; MC, mixed cellularity; NLPHL, nodular lymphocyte predominant Hodgkin Lymphoma.

Table 2 Clinical features of DLBCL of oral cavity

<i>Case</i>	<i>Age / gender</i>	<i>Localization</i>	<i>Histologic / type</i>	<i>Clinical presentation</i>
9	78 / F	Low alveolar ridge	EBV+ / DLBCL / Elderly / Large cells	NR
10	83 / F	Body of Mandible	DLBCL NOS / Centroblastic	Paresthesia ipsilateral
11	26 / F	Cheek	DLBCL / Unclassifiable	HIV, ulcer evolution 1 month
12	51 / M	Upper posterior gingiva	DLBCL / Unclassifiable	Purple tumor, destruction of adjacent bone
13	69 / M	Tongue base	DLBCL NOS / Immunoblastic	Ulcerated mass
14	59 / M	Palate	DLBCL NOS / Immunoblastic	HIV, ulcerated tumor
15	80 / F	Alveolar ridge	EBV+ / DLBCL / Elderly / Polymorphous	Painful ulcer

Oral cases

EBV+, Epstein-Bar virus positive; DLBCL, diffuse large B-cell lymphoma; NOS, Not otherwise specified; IHC, immunohistochemistry; EBV, Epstein-Bar virus; NR, not reported.

Table 3 Distribution of microvascular parameters between groups, Hodgkin lymphoma (HL) and oral diffuse large B-cell lymphoma HRS-like (ODLBCL)

	MVD			MVA			TVA		
	HL	ODLBCL	p	HL	ODLBCL	P	HL	ODLBCL	p
	Mean (±)	Mean (±)		Mean (±)	Mean (±)		Mean (±)	Mean (±)	
CD34	20.33 (3.1)	10.06 (0.70)	0.001	126 (14.90)	107.33 (3.13)	0.08	2570.01 (538.82)	1069.25 (51.68)	0.01
CD31	19.2 (2.89)	9,66 (0.82)	0.001	135.91 (19.35)	109.28 (3.61)	0.04	2590.89 (544.96)	1059.51 (100.04)	0.001
vWF	19.8 (3)	9,89 (0.69)	0.001	131.91 (16.39)	106.55 (4.28)	0.20	2590.16 (538.53)	1057.72 (79.37)	0.001
CD105	11.4 (0.63)	6,21 (0.64)	0.001	82.77 (4.75)	77.69 (5.87)	0.001	931.96 (35.95)	475.09 (36.17)	0.002
D2-40	9.6 (0,47)	4,24 (0.52)	0.001	113.64 (10.42)	80.08 (2.61)	0.001	1096.98 (63.91)	335.33 (33.67)	0.001
VEGF	6.5 (0,62)	3,7 (0.45)	0.001	221.65 (23.93)	128.12 (7.76)	0.35	1435.25 (109.90)	467.22 (44.09)	0.001
Mast cell	23.7 (1.04)	15,57 (0.98)	0.001						

MVD, micro vessel density; MVA, micro vessel area; TVA, total vascular area Mann Whitney test

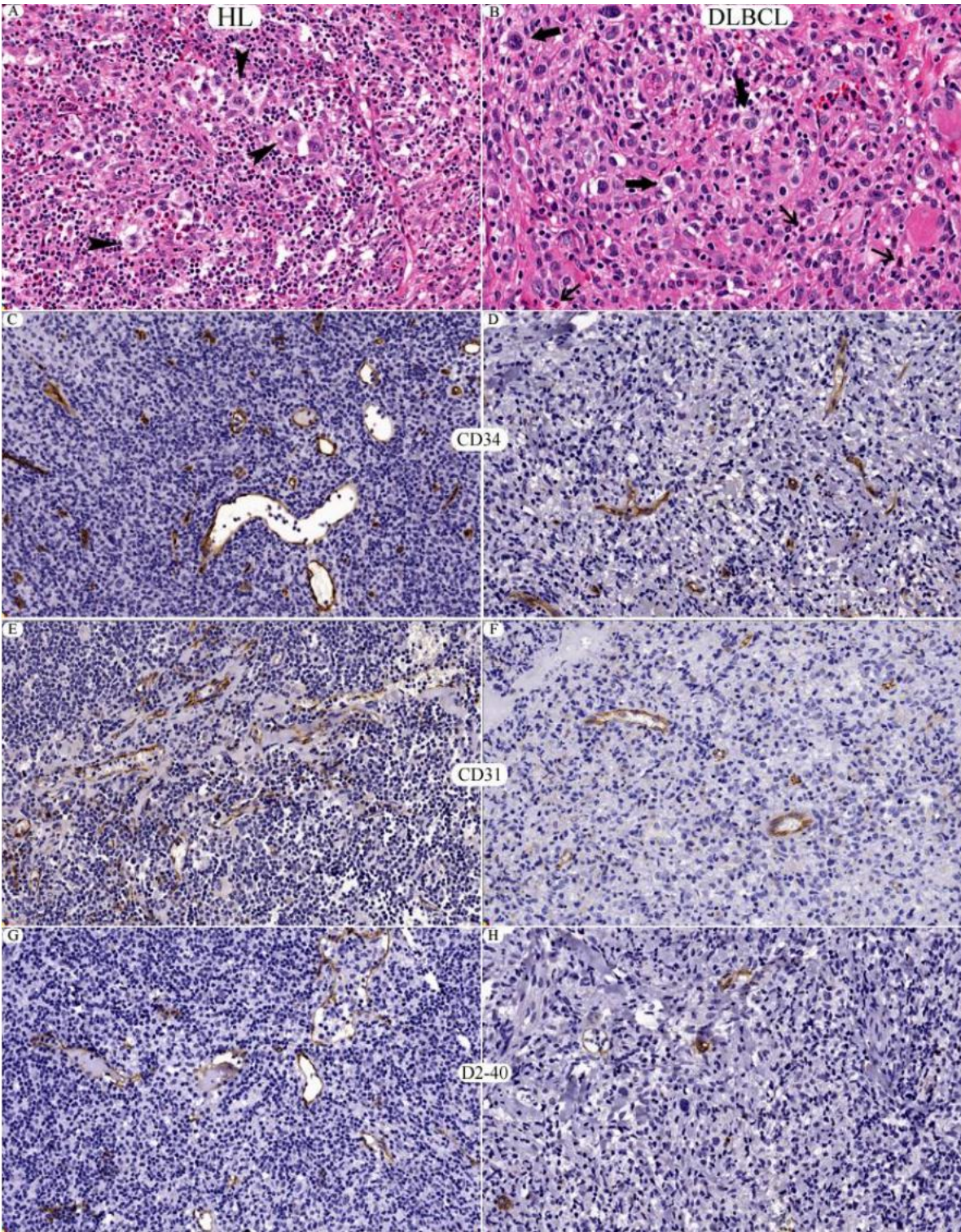


Figure 1. Haematoxylin and eosin of morphological characteristics of HL and oral DLBCL with HRS-like cells and immunohistochemical findings for CD34, CD31 and, D2-40. (A) A typical diagnostic Hodgkin Reed-Sternberg (HRS) cell (Head arrow) within a composite inflammatory milieu (haematoxylin and eosin; original magnification x 400). (B) Morphological characteristics of oral DLBCL with HRS-cells-like (large arrow), within moderately sclerotic stroma and inflammatory milieu highlighting the eosinophil cells (thin arrows) (haematoxylin and eosin; original magnification x 400). Vessels highlighted with CD34 and CD31, greater number in vessels in HL cases, but without statistical significance (C, E), in relation to oral DLBCL (D, H). The lymphatic vessels expression with D2-40 was statistically significant in HL cases (G), compared with oral DLBCL (H). All immunohistochemical images in original magnification x200.

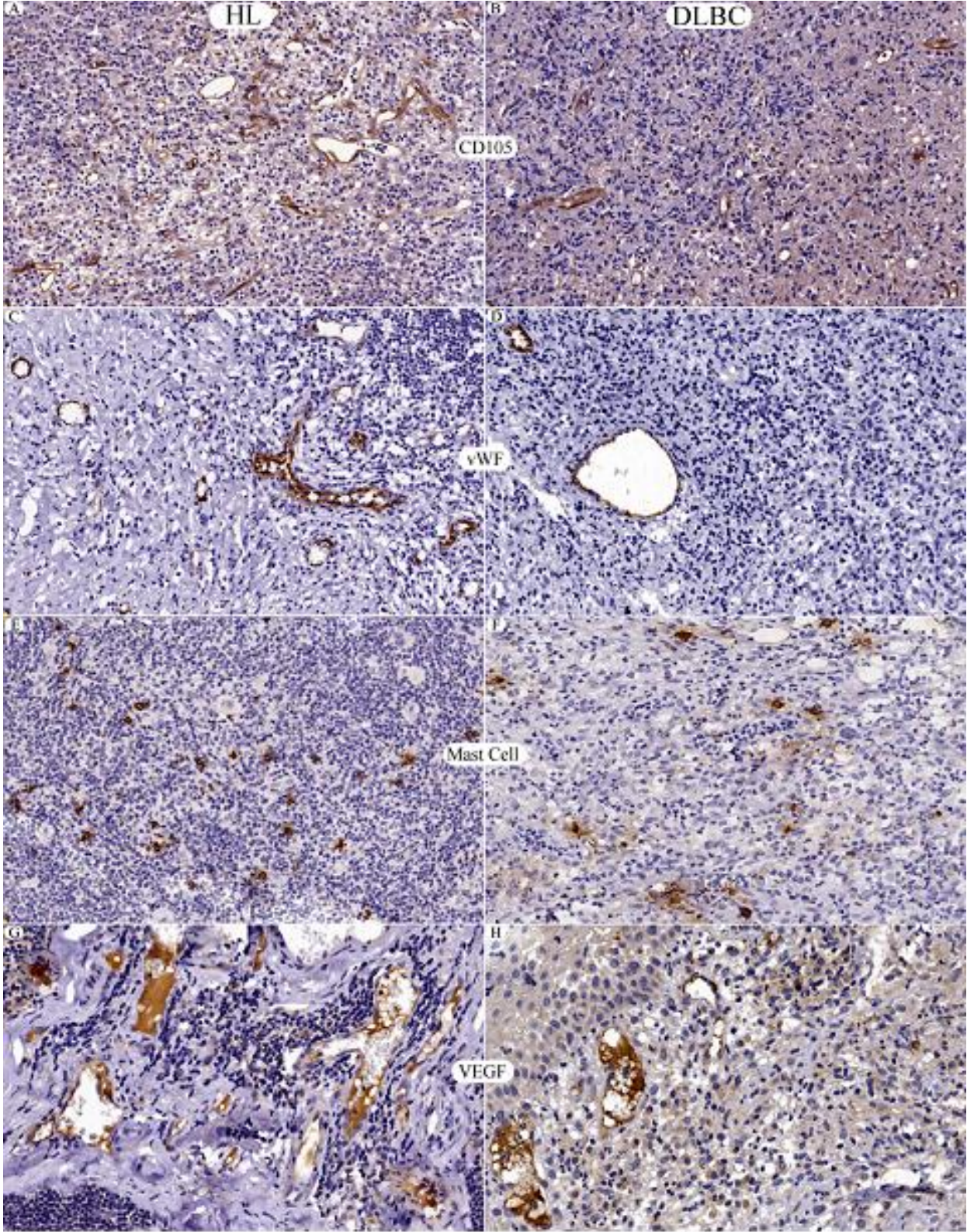


Figure 2. Illustration of the immunohistochemical findings for CD105, FVIII, Mast cell and, VEGF. Endothelial cells of vessels in the tumor area positive with CD105 (A) in HL and oral DLBCL, being more prominent in nodal cases. The positive index in HL (C) with FVIII was bigger than oral DLBCL cases (D). The Mast cell positive cells were statistically significant in HL cases, they were identified among H-RS cells and around vessels (E). In oral cases these cells were observed next to vascular structures and large cells (HRS-like) (F). Finally, few vessels were recognized by VEGF in both HL(G) and oral DLBCL (H). All immunohistochemical images in original magnification x200.

CAPÍTULO 3¹

ORAL DIFFUSE LARGE B-CELL LYMPHOMA WITH HODGKIN/REED–STERNBERG-LIKE CELLS AND NODAL CLASSICAL HODGKIN LYMPHOMA: A COMPARATIVE STUDY OF DENDRITIC CELLS

Victor Hugo Toral Rizo, DDS, PhD student,¹ Wilson Delgado Azañero, DDS, PhD,² Adalberto Mosqueda-Taylor, DDS, PhD,³ Oslei Paes Almeida, DDS, PhD,¹ Jorge Esquiche León, DDS, PhD.⁴

¹ Oral Pathology Section, Department of Oral Diagnosis, Piracicaba Dental School, University of Campinas-FOP/Unicamp, Piracicaba, São Paulo, Brazil.

² Department of Oral Medicine, Oral Surgery and Oral Pathology, Faculty of Dentistry, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Perú.

³ Department of Health Care, Universidad Autónoma Metropolitana, Xochimilco, México.

⁴ Oral Pathology, Department of Stomatology, Dentistry School of Ribeirão Preto, University of São Paulo (USP), Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil.

Running Title: Dendritic cells in Hodgkin lymphoma and non-Hodgkin lymphoma.

Conflict of interest: No conflicts of interest to disclose.

Supported by: Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Corresponding author:

Victor Hugo Toral Rizo

Departamento de Diagnóstico Oral, Área de Patologia Oral. Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

Av. Limeira 901, Barrio Areião. Piracicaba, São Paulo, Brazil.

CEP 13.414-903.

Tel.: +55 19 2106-5315; Fax: +55 19 2106-5218

E-mail: toralrizo@hotmail.com

¹ Este trabalho foi realizado no formato alternativo conforme Deliberação CCPG/002/06 da Comissão Central de Pós-Graduação (CCPG) da Universidade Estadual de Campinas.

Abstract: Dendritic cells (DCs) are specialized antigen presenting cells (APC) with an important participation in host defenses, producing anti-tumor immune response.

Objective: The objective of this study to analyze the identification, density, and distribution, of dendritic cells (DCs) in diffuse large B-cell lymphoma of the oral cavity with HRS-like cells (ODLBCL-HRS-like) and compare with cases of Hodgkin's lymphoma (HL) through broad immunohistochemical panel for DCs.

Study design. We studied 15 cases of which, 8 cases of classical HL, and 7 cases of oral lymphoma 5 of these cases were classified as DLBCL, NOS, and 2 cases as EBV-positive DLBCL of the elderly. Evaluation of immunohistochemistry expression of DCs with antibodies CD1a, CD83, CD123, CD207, S-100, and FXIIIa.

Results: The DC subsets, in HL and ODLBCL-HRS-like were statistically significant between both groups, except CD83, which did not show statistical significance. Dendritic cells expressing CD1a, CD83, CD207 were few in number in all ODLBCL-HRS-like tissues. Factor XIIIa and S-100 has a density considerably higher to HL and in ODLBCL-HRS-like. The distribution of CD123 in HL were arranged in clusters, in close proximity of small venule, showing prominent CD123+ endothelial cells. In ODLBCL-HRS-like was observed loosely and scarce arranged cluster of CD123+. The distribution of DCs was mainly in the tumor area, around neoplastic cells in both entities.

Conclusion: We described, characterized and compared the relation between DCs density in HL and oral DLBCL. DCs can be used as a prognostic factor. The significant presence of CD in these tumors probably plays an important pathological role in lymphomas. Our results suggest that the increase in the number of CD appears to be a contributing factor to the immune response stimulated by tumor growth. Understanding the mechanisms involved in regulatory dendritic cell, will provide additional opportunities to modify the tumor microenvironment and improve the efficacy of different therapeutic approaches to lymphomas.

Key-Words: Hodgkin lymphoma; oral cavity; diffuse large B-cell lymphoma; Hodgkin/Reed-Sternberg-like cells; dendritic cells.

Introduction

Dendritic cells (DCs) are specialized antigens, presenting cells (APC) with an important participation in host defenses, producing anti-tumor immune response (Cella *et al.* 1997, Hussin *et al.* 2009, Ma *et al.* 2013). DCs are bone marrow derived and are the charge in the immune system for the initiation of primary, T-cell based immune responses (Ardavin *et al.* 2001, Ardavin 2003). The DCs has four stages of development including: 1) bone marrow progenitors; 2) precursor DCs, that are patrolling through blood and lymphatics as well as lymphoid tissues, and that, upon pathogen recognition, releases large amounts of cytokines; 3) tissue-residing immature DCs, wich possessess high endocytic and phagocytic capacity permitting Ag capture; and 4) mature DCs, present within secondary lymphoid organs, that express high levels of costimulatory molecules permitting Ag presentation (Cella *et al.* 1997, Banchereau *et al.* 1998, Banchereau *et al.* 2000, Ma *et al.* 2012).

The distributions of DCs are widely in immature state in various tissues and has the ability of endocytosis (Cella *et al.* 1997, Banchereau and Steinman 1998, Bakdash *et al.* 2013). Anatomical localization includes skin epidermal LCs, dermal (interstitial) DCs (intDCs), splenic marginal DCs, T-cone interdigitating cells, germinal-center DCs, thymic DCs, liver DCs, and blood DCs. Phenotypic differences have been observed among these different DC subsets, and their lineage origins, maturation stages, and functional differences have not been clearly established (Banchereau *et al.* 2000). The functionality of human DC subsets exert different functions, particularly in the regulation of B cell proliferation and differentiation of T cell toward type1 or type 2 (Cella *et al.* 1997, Banchereau *et al.* 2000, Wang *et al.* 2004). The infiltration by DCs in tumours is an example of the host immune defense mechanisms (Cella *et al.* 1997, Banchereau and Steinman 1998, Wathelet *et al.* 2013). Sometimes, the immune system has the potential to eliminate neoplastic cells, as evidenced by occasional spontaneous remissions in renal-cell carcinomas, melanomas and lymphomas (Bell *et al.* 1999, Palucka *et al.* 1999, Timmerman *et al.* 1999, Banchereau *et al.* 2000, Gunzer *et al.* 2001, Tamas *et al.* 2011, Mizuno *et al.* 2013). Studies have reported the favorable prognostic significance of the presence of DCs in some malignant tumours (Ambe *et al.* 1989, Nakano *et al.* 1989, Troy *et al.* 1998,

Iwamoto *et al.* 2003, Yilmaz *et al.* 2005). The unique ability of DCs to induce and sustain primary immune responses makes them optimal candidates for vaccination protocols in cancer (Steinman *et al.* 1997, Nair *et al.* 1999, Timmerman and Levy 1999, Banchereau *et al.* 2000, Grille *et al.* 2010). The identification of DCs in HL have been reported with the suggestion that the of origin of the characteristic Hodgkin, Reed-Sternberg cells (HRSc) in the Hodgkin lymphoma is from these cells (Kennedy *et al.* 1989, Alavaikko *et al.* 1991, Delsol *et al.* 1993, Sahin *et al.* 2002). Reduction in DC numbers on Hodgkin's lymphoma and non-Hodgkin's lymphomas has been reported and this reduction had potential contribution to the loss of tumor control (Fiore *et al.* 2006, Hussin *et al.* 2009, Benharroch *et al.* 2010, Steidl *et al.* 2011). Other point studied by researchers is the prognostic factor of some DCs in Hodgkin's lymphoma (Alavaikko *et al.* 1994, Baur *et al.* 1998, Hussin *et al.* 2009, Benharroch *et al.* 2010, Steidl *et al.* 2011). Considering oral lymphomas, only one study was performed, and it concluded that the microenvironment in this type of lymphomas is responsible by the development and expression of DCs (Mesquita *et al.* 2009).

Materials and Methods

This research was previously approved by the ethical committee in human research of State University of Campinas (036/2012). All cases used on this work were classified according to the 2008 WHO classification of tumors of haematopoietic and lymphoid tissues (Swerdlow *et al.* 2008). Were screened 30 cases of which, eight cases corresponded to cHL, the most involved the cervical lymph nodes. Seven cases corresponded to oral DLBCL-HRS (5 cases were classified as DLBCL, not otherwise specified [DLBCL, NOS], and 2 cases as EBV-positive DLBCL of the elderly) (**Tables 1 and 2**). Primary nodal cHL patients comprised 6 males and 2 females, with a median age of 47 years. Five and 3 cases of cHL were classified as nodular sclerosis and mixed cellularity subtypes, respectively (**Table 1**).

Primary oral DLBCL-HRS patients comprised 4 females and 3 males, with a mean age of 70 years (range, 26-83 years). Four cases involved the alveolar ridge, and one case each the cheek, base of the tongue and palate (**Table 2**).

Immunohistochemical stains also were performed as part of this study, using fixed, paraffin-embedded tissue sections 3- μ m thick were placed on silanized slides and were stained using avidin-biotin peroxidase complex technique and head-induce epitope retrieval buffer. Immunodetection was performed with peroxidase-labelled streptavidin biotin (LSAB; Dako, Copenhagen, Denmark), using diaminobenzidine chromogen as substrate. The panel of monoclonal antibodies and their clones used for the identifications of DCs were: CD1a, CD207, CD83, CD123, FXIIIa, and S-100. The sources of antibodies used were as follows: CD1a (010), S-100 (Z 0311) Dako, Copenhagen, Denmark. CD123 (BR4MS), FXIIIa (E980.1) from Leica Biosystems Newcastle, United Kingdom. The evaluations of these antibodies the slides were scanning with ScanScope® System, and then examined carefully with a magnification of 10 X low power ocular lens to identify the areas with the highest concentration (Hot spot) of DCs. Only the cells with dendritic cytoplasmic processes were counted (Chang *et al.* 2007). In each case were selected ten intra tumor areas and made ten images for each hot spot area, with an X 20 objective (0.72 mm²) magnification, using ScanScope® System, the photographs were captured in TIFF (True Image Format File) and analyzed with NIH's ImageJ program. The aim of this study is analyze the identification, count, and distribution, of DCs in, oral DLBCL and compare with HL. The statistical analysis was done with appropriate statistical tests examining the relationships and correlations between variables, including Kruskal-Wallis One-Way ANOVA and Spearman Correlations.

Results

This study characterized the DC subsets, in HL and ODLBCL-HRS-like and we observed statistical significance between both groups with almost all antibodies, except for CD83, which did not show statistical significance (**Table 3**). Dendritic cells expressing CD1a, CD83, CD207 were few in number in all ODLBCL-HRS-like tissues (**Fig. 2**).

Immunoexpression of Factor XIIIa (**Fig. 3**) and S-100 (**Fig. 2**) has a density considerably higher to HL (mean 29.42, \pm 3.65 and, 30.90 \pm 1.26 respectively) and in ODLBCL-HRS-like (mean 11.84, \pm 1.14 and 12.02 \pm 0.78, respectively). Similar to this antibody, S-100 showed high density in HL. These two markers have the major density in

relation to the others antibodies. The distribution of DCs with FXIIIa and S-100 was mainly in the tumor area, around of neoplastic cells in both entities.

The distribution of CD123 positive cells was mainly around lymphatic or blood vessels and scarce in tumor beds (**Fig. 3**). CD123 in HL (**Fig. 3C**) was arranged in clusters, in close proximity to small venule, showing prominent CD123+ endothelial cells. These vessels exhibit close similarity with high endothelial venules of the lymph node. In ODLBCL-HRS-like (**Fig. 3 D**) was observed loosely and scarce arranged cluster of CD123+.

Discussion

This study, by the first time, analyses the CDs in HL and ODLBCL-HRS-like with a broad IHC panel. Evidence suggests that feedback processes (in dynamic and bidirectional way) among cancer cells and in the network of reactive cells in their microenvironment play a critical role during different development stages of most malignancies and their progression. Lymphomas are malignant neoplasms consisting of lymphocytes with monoclonal proliferation, which proliferate autonomously and uncontrollably, over running the normal lymphocytic population (Coupland 2011, Martelli *et al.* 2013). In this study, we observed that, LH had bigger count of DCs with all antibodies when compared with ODLBCL (**Table 3**) (**Fig. 2-3**). Studies on altered DCs numbers have been reported in patients with malignant disorders and these findings were clinically relevant and have shown association with poorer prognosis (Iwamoto *et al.* 2003, Sandel *et al.* 2005, Kocian *et al.* 2011).

The DCs CD1a+ (immature) in HL had statistically significance (mean 4.91 ± 1.23 , $p < 0.01$) and CDs CD83+ (mature) were not significant. This result are consistent with studies in which patients with different malignancies, including lymphoma were observed the presence of CD1a+ in tumor area, indicating that some tumors could actively recruit immature DCs to the tumor site but subsequently impede their differentiation into fully functional antigen-presenting cell (Troy *et al.* 1998, Bell *et al.* 1999, Hussin *et al.* 2009, Braz-Silva *et al.* 2011). Immature DCs cannot induce anti-tumor immune responses, but most importantly is that, this DC can induce tolerance or energy (Smyth *et al.* 2001).

Various malignancies could actively recruit immature DCs to the tumor site, impede their differentiation and promote the cell death, thus impairing the function of DCs (Bell *et al.* 1999, Pinzon-Charry *et al.* 2006). Some authors stated that this capacity may also be another mechanism to explain why tumors cells escape immune surveillance (Idoyaga J *et al.* 2007, Hussin *et al.* 2009, Ma *et al.* 2013). The association with outcome and increased in numbers of immature DCs is controversial, while some authors considered that is unfavorable (Della Bella *et al.* 2003, Sandel *et al.* 2005, Galand *et al.* 2012) others showed that the presence of CD1a+ DCs within tumors were correlated with favorable outcome (Monti *et al.* 2005, Chang *et al.* 2007).

Chang *et al.*, (Chang *et al.* 2007) analyzed the distribution patterns of T cells and DCs, in large B-cell lymphomas, and correlated with prognostic. They also reported that increased of DCs S-100+ in tumor area did not contribute for a better outcome, which was reported by other authors as well (Iwamoto *et al.* 2003, Sandel *et al.* 2005, Mesquita *et al.* 2009, Goncalves *et al.* 2012). In our study, the S-100+ DCs showed statistical significance (mean 30.90 ± 1.26 , $p < 0.0003$) in tumor area of HL and was observed in considerable number (mean 12.02 ± 0.78) in cases of ODLBCL. The antibody S-100 was counted considering cells with dendritic morphology, and was considered like independent and perhaps comparable to measure of the DCs number at all maturation stages (Vermi *et al.* 2003, Chang *et al.* 2007). Moreover, FXIIIa in our study, along with S-100, showed a great number of DCs (**Table 3**), and can be considered with the same value as the S100, recognizing most types of DCs in different stage of maturation. The expression of FXIIIa, serve to identify a population of bone marrow-derived dermal DCs, that are distinct from Langerhans cells but appears to function as antigen-presenting cell (Polak *et al.* 2005).

The antibodies CD83+ and CD1a+ in DCs of our cases of DLBCL are similar to those reported in the literature (Chang *et al.* 2007), where the number of CD83+ is greater than those of CD1a+ in tumor area. This fact suggests that, maturation and differentiation of intratumoral DCs could be achieved in a subset of DLBCL and might serve as a therapeutic target (Braz-Silva *et al.* 2011, Segura *et al.* 2012).

Langerhans cells (LCs) represent a unique DC subset and populate the epidermis of the body. The CD1a and langerin (CD207) are used as specific markers to distinguish LCs

from other DC subsets (Mizumoto *et al.* 2004). In our cases of HL, CD1a (mean 4.91 ± 1.23) and CD207 (mean 4.17 ± 1.99) showed similar values, suggesting that CD1a and CD207 are considered specific marker to LCs (Mizumoto and Takashima 2004). Conversely, Braz-Silva *et al.* (Braz-Silva *et al.* 2011), reported that the cases of HL did not contain CD1a+, indicating that DCs were not recruited in HL. Additionally, they showed that EBV+ cell clusters in human tissues are highly infiltrated with CD207+ CDs. This observation may appear in contradiction with a previous study (Walling *et al.* 2004) showing that LCs were lacking from EBV-infected epithelium in oral hairy leukoplakia from HIV-infected people.

Plasmacytoid dendritic cells (PDC) is recognized by immunoexpression of CD123 and plays a crucial role in the initiation of immune responses and activation of T-cells and B-cells and, is hypothesize that this cell, may be important in the initiation and growth maintenance in some lymphomas. (Kutzner *et al.* 2009). In our cases of HL and ODLBCL, were observed PDC CD123+ (mean 21.57 ± 2.46 , 3.69 ± 1.96 , respectively). In none of our cases was identified immunoreactivity of tumor cells by CD123. However, in a study with Flow Cytometric (Fromm 2011) in HL and DLBCL was identified 59% and 1.8% of positive cells, respectively. In the same study, where also analyzed reactive lymph nodes and only a few cell population including PDCs and monocytes expressed CD123.

Conclusion

We described, characterized and compared the relation between DCs density in HL and oral DLBCL. DCs can be used as a prognostic factor. The significant presence of CD in these tumors probably plays an important pathological role in lymphomas. Our results suggest that the increase in the number of CD appears to be a contributing factor to the immune response stimulated by tumor growth.

REFERENCES

1. Alavaikko MJ, Blanco G, Aine R, Lehtinen T, Fellbaum C, Taskinen PJ, *et al.* Follicular dendritic cells have prognostic relevance in Hodgkin's disease. *Am J Clin Pathol.* 1994 Jun;101(6):761-7.
2. Alavaikko MJ, Hansmann ML, Nebendahl C, Parwaresch MR, Lennert K. Follicular dendritic cells in Hodgkin's disease. *Am J Clin Pathol.* 1991 Feb;95(2):194-200.
3. Ambe K, Mori M, Enjoji M. S-100 protein-positive dendritic cells in colorectal adenocarcinomas. Distribution and relation to the clinical prognosis. *Cancer.* 1989 Feb 1;63(3):496-503.

4. Ardavin C. Origin, precursors and differentiation of mouse dendritic cells. *Nat Rev Immunol.* 2003 Jul;3(7):582-90.
5. Ardavin C, Martinez del Hoyo G, Martin P, Anjuere F, Arias CF, Marin AR, et al. Origin and differentiation of dendritic cells. *Trends Immunol.* 2001 Dec;22(12):691-700.
6. Bakdash G, Sittig SP, van Dijk T, Figdor CG, de Vries IJ. The nature of activatory and tolerogenic dendritic cell-derived signal II. *Front Immunol.* 2013;4:53.
7. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol.* 2000;18:767-811.
8. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature.* 1998 Mar 19;392(6673):245-52.
9. Baur AS, Meuge-Moraw C, Michel G, Delacretaz F. Prognostic value of follicular dendritic cells in nodular sclerosing Hodgkin's disease. *Histopathology.* 1998 Jun;32(6):512-20.
10. Bell D, Chomarar P, Broyles D, Netto G, Harb GM, Lebecque S, et al. In breast carcinoma tissue, immature dendritic cells reside within the tumor, whereas mature dendritic cells are located in peritumoral areas. *J Exp Med.* 1999 Nov 15;190(10):1417-26.
11. Bell D, Young JW, Banchereau J. Dendritic cells. *Adv Immunol.* 1999;72:255-324.
12. Benharroch D, Guterman G, Levy I, Shaco-Levy R. High content of Langerhans cells in malignant lymphoma--incidence and significance. *Virchows Arch.* 2010 Jul;457(1):63-7.
13. Braz-Silva PH, Vitale S, Butori C, Guevara N, Santini J, Magalhaes M, et al. Specific infiltration of langerin-positive dendritic cells in EBV-infected tonsil, Hodgkin lymphoma and nasopharyngeal carcinoma. *Int J Cancer.* 2011 May 15;128(10):2501-8.
14. Cella M, Sallusto F, Lanzavecchia A. Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. *Curr Opin Immunol.* 1997 Feb;9(1):10-6.
15. Chang KC, Huang GC, Jones D, Lin YH. Distribution patterns of dendritic cells and T cells in diffuse large B-cell lymphomas correlate with prognoses. *Clin Cancer Res.* 2007 Nov 15;13(22 Pt 1):6666-72.
16. Coupland SE. The challenge of the microenvironment in B-cell lymphomas. *Histopathology.* 2011 Jan;58(1):69-80.
17. Della Bella S, Gennaro M, Vaccari M, Ferraris C, Nicola S, Riva A, et al. Altered maturation of peripheral blood dendritic cells in patients with breast cancer. *Br J Cancer.* 2003 Oct 20;89(8):1463-72.
18. Delsol G, Meggetto F, Brousset P, Cohen-Knafo E, al Saati T, Rochaix P, et al. Relation of follicular dendritic reticulum cells to Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease with emphasis on the expression of CD21 antigen. *Am J Pathol.* 1993 Jun;142(6):1729-38.
19. Fiore F, Von Bergwelt-Baildon MS, Drebbler U, Beyer M, Popov A, Manzke O, et al. Dendritic cells are significantly reduced in non-Hodgkin's lymphoma and express less CCR7 and CD62L. *Leuk Lymphoma.* 2006 Apr;47(4):613-22.
20. Fromm JR. Flow cytometric analysis of CD123 is useful for immunophenotyping classical Hodgkin lymphoma. *Cytometry B Clin Cytom.* 2011 Mar;80(2):91-9.
21. Galand C, Donnou S, Molina TJ, Fridman WH, Fisson S, Sautes-Fridman C. Influence of Tumor Location on the Composition of Immune Infiltrate and Its Impact on Patient Survival. Lessons from DCBCL and Animal Models. *Front Immunol.* 2012;3:98.

22. Goncalves AS, Costa NL, Arantes DA, de Cassia Goncalves Alencar R, Silva TA, Batista AC. Immune response in cervical lymph nodes from patients with primary oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*. 2012 Dec 26.
23. Grille S, Brugnini A, Nese M, Corley E, Falkenberg FW, Lens D, et al. A B-cell lymphoma vaccine using a depot formulation of interleukin-2 induces potent antitumor immunity despite increased numbers of intratumoral regulatory T cells. *Cancer Immunol Immunother*. 2010 Apr;59(4):519-27.
24. Gunzer M, Janich S, Varga G, Grabbe S. Dendritic cells and tumor immunity. *Semin Immunol*. 2001 Oct;13(5):291-302.
25. Hussin HN, Zulkifli FN, Phang KS, Cheong SK. Dendritic cell distribution in lymphomas. *Malays J Pathol*. 2009 Dec;31(2):105-12.
26. Idoyaga J, Moreno J, Bonifaz L. Tumor cells prevent mouse dendritic cell maturation induced by TLR ligands. *Cancer Immunol Immunother*. 2007;56(8):1237-50.
27. Iwamoto M, Shinohara H, Miyamoto A, Okuzawa M, Mabuchi H, Nohara T, et al. Prognostic value of tumor-infiltrating dendritic cells expressing CD83 in human breast carcinomas. *Int J Cancer*. 2003 Mar 10;104(1):92-7.
28. Kennedy IC, Hart DN, Colls BM, Nimmo JC, Willis DA, Angus HB. Nodular sclerosing, mixed cellularity and lymphocyte-depleted variants of Hodgkin's disease are probable dendritic cell malignancies. *Clin Exp Immunol*. 1989 Jun;76(3):324-31.
29. Kocian P, Sedivcova M, Drgac J, Cerna K, Hoch J, Kodet R, et al. Tumor-infiltrating lymphocytes and dendritic cells in human colorectal cancer: their relationship to KRAS mutational status and disease recurrence. *Hum Immunol*. 2011 Nov;72(11):1022-8.
30. Kutzner H, Kerl H, Pfaltz MC, Kempf W. CD123-positive plasmacytoid dendritic cells in primary cutaneous marginal zone B-cell lymphoma: diagnostic and pathogenetic implications. *Am J Surg Pathol*. 2009 Sep;33(9):1307-13.
31. Ma SP, Lin M, Liu HN, Yu JX. Lymphangiogenesis in non-Hodgkin's lymphoma and its correlation with cyclooxygenase-2 and vascular endothelial growth factor-C. *Oncol Lett*. 2012 Oct;4(4):695-700.
32. Ma Y, Shurin GV, Peiyuan Z, Shurin MR. Dendritic cells in the cancer microenvironment. *J Cancer*. 2013;4(1):36-44.
33. Martelli M, Ferreri AJ, Agostinelli C, Di Rocco A, Pfreundschuh M, Pileri SA. Diffuse large B-cell lymphoma. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2013 Jan 30.
34. Mesquita RA, de Araujo VC, Paes RA, Nunes FD, de Souza SC. Immunohistochemical analysis for CD21, CD35, Caldesmon and S100 protein on dendritic cells types in oral lymphomas. *J Appl Oral Sci*. 2009 May-Jun;17(3):248-53.
35. Mizumoto N, Takashima A. CD1a and langerin: acting as more than Langerhans cell markers. *J Clin Invest*. 2004 Mar;113(5):658-60.
36. Mizuno T, Ishigaki M, Nakajima K, Matsue T, Fukushima M, Minato H, et al. Spontaneous remission of epstein-barr virus-positive diffuse large B-cell lymphoma of the elderly. *Case Rep Oncol*. 2013 May;6(2):269-74.
37. Monti S, Savage KJ, Kutok JL, Feuerhake F, Kurtin P, Mihm M, et al. Molecular profiling of diffuse large B-cell lymphoma identifies robust subtypes including one characterized by host inflammatory response. *Blood*. 2005 Mar 1;105(5):1851-61.
38. Nair SK, Hull S, Coleman D, Gilboa E, Lysterly HK, Morse MA. Induction of carcinoembryonic antigen (CEA)-specific cytotoxic T-lymphocyte responses in vitro using

- autologous dendritic cells loaded with CEA peptide or CEA RNA in patients with metastatic malignancies expressing CEA. *Int J Cancer*. 1999 Jul 2;82(1):121-4.
39. Nakano T, Oka K, Arai T, Morita S, Tsunemoto H. Prognostic significance of Langerhans' cell infiltration in radiation therapy for squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Arch Pathol Lab Med*. 1989 May;113(5):507-11.
40. Palucka K, Banchereau J. Dendritic cells: a link between innate and adaptive immunity. *J Clin Immunol*. 1999 Jan;19(1):12-25.
41. Pinzon-Charry A, Maxwell T, McGuckin MA, Schmidt C, Furnival C, Lopez JA. Spontaneous apoptosis of blood dendritic cells in patients with breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2006;8(1):R5.
42. Polak ME, Johnson P, Di Palma S, Higgins B, Hurren J, Borthwick NJ, et al. Presence and maturity of dendritic cells in melanoma lymph node metastases. *J Pathol*. 2005 Sep;207(1):83-90.
43. Sahin U, Neumann F, Tureci O, Schmits R, Perez F, Pfreundschuh M. Hodgkin and Reed-Sternberg cell-associated autoantigen CLIP-170/restin is a marker for dendritic cells and is involved in the trafficking of macropinosomes to the cytoskeleton, supporting a function-based concept of Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *Blood*. 2002 Dec 1;100(12):4139-45.
44. Sandel MH, Dadabayev AR, Menon AG, Morreau H, Melief CJ, Offringa R, et al. Prognostic value of tumor-infiltrating dendritic cells in colorectal cancer: role of maturation status and intratumoral localization. *Clin Cancer Res*. 2005 Apr 1;11(7):2576-82.
45. Segura E, Valladeau-Guilemond J, Donnadieu MH, Sastre-Garau X, Soumelis V, Amigorena S. Characterization of resident and migratory dendritic cells in human lymph nodes. *J Exp Med*. 2012 Apr 9;209(4):653-60.
46. Smyth MJ, Godfrey DI, Trapani JA. A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy. *Nat Immunol*. 2001 Apr;2(4):293-9.
47. Steidl C, Connors JM, Gascoyne RD. Molecular pathogenesis of Hodgkin's lymphoma: increasing evidence of the importance of the microenvironment. *J Clin Oncol*. 2011 May 10;29(14):1812-26.
48. Steinman RM, Pack M, Inaba K. Dendritic cells in the T-cell areas of lymphoid organs. *Immunol Rev*. 1997 Apr;156:25-37.
49. Swerdlow SH, Jaffe E, Pileri A, Stein H, et al. WHO Classification of tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Fourth ed. ed. IARC, editor. Lyon, France: IARC; 2008.
50. Tamas L, Sari E, Repassy G, Szabo P, Bagdi E, Krenacs L, et al. Spontaneous remission in localized diffuse large B-cell lymphoma. *Pathol Oncol Res*. 2011 Sep;17(3):779-84.
51. Timmerman JM, Levy R. Dendritic cell vaccines for cancer immunotherapy. *Annu Rev Med*. 1999;50:507-29.
52. Troy AJ, Summers KL, Davidson PJ, Atkinson CH, Hart DN. Minimal recruitment and activation of dendritic cells within renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. 1998 Mar;4(3):585-93.
53. Vermi W, Bonecchi R, Facchetti F, Bianchi D, Sozzani S, Festa S, et al. Recruitment of immature plasmacytoid dendritic cells (plasmacytoid monocytes) and myeloid dendritic cells in primary cutaneous melanomas. *J Pathol*. 2003 Jun;200(2):255-68.

54. Walling DM, Flaitz CM, Hosein FG, Montes-Walters M, Nichols CM. Effect of Epstein-Barr virus replication on Langerhans cells in pathogenesis of oral hairy leukoplakia. *J Infect Dis.* 2004 May 1;189(9):1656-63.
55. Wang T, Niu G, Kortylewski M, Burdelya L, Shain K, Zhang S, et al. Regulation of the innate and adaptive immune responses by Stat-3 signaling in tumor cells. *Nat Med.* 2004 Jan;10(1):48-54.
56. Wathelet N, Moser M. Role of dendritic cells in the regulation of antitumor immunity. *Oncoimmunology.* 2013 Apr 1;2(4):e23973.
57. Yilmaz T, Gedikoglu G, Celik A, Onerci M, Turan E. Prognostic significance of Langerhans cell infiltration in cancer of the larynx. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2005 Feb;132(2):309-16.

Table 1. Clinical features of primary Hodgkin lymphoma

<i>Case</i>	<i>Age / gender</i>	<i>Localization</i>	<i>Histologic type</i>
1	60 / M	Left cervical lymph node	cHL / NS
2	6 / M	Left Submandibular	cHL / NS
3	45 / M	Left supraclavicular Lymph node	cHL / NS
4	58 / M	Right cervical and supraclavicular lymph node	cHL / MC
5	68 / F	Cervical lymph node	cHL / MC
6	78 / M	Neck	cHL / NS
7	40 /M	Submandibular	cHL / MC
8	26 /F	Left supraclavicular Lymph node	cHL / NS

M, male; F, female; cHL, classical Hodgkin Lymphoma; NS, nodular sclerosis; MC, mixed cellularity; NLPHL, nodular lymphocyte predominant Hodgkin Lymphoma.

Table 2. Clinical features of DLBCL of oral cavity

<i>Case</i>	<i>Age / gender</i>	<i>Localization</i>	<i>Histologic / type</i>	<i>Clinical presentation</i>
9	78 / F	Low alveolar ridge	EBV+ / DLBCL / Elderly / Large cells	NR
10	83 / F	Body of Mandible	DLBCL NOS / Centroblastic	Paresthesia ipsilateral
11	26 / F	Cheek	DLBCL / Unclassifiable	HIV, ulcer evolution 1 month
12	51 / M	Upper posterior gingiva	DLBCL / Unclassifiable	Purple tumor, destruction of adjacent bone
13	69 / M	Tongue base	DLBCL NOS / Immunoblastic	Ulcerated mass
14	59 / M	Palate	DLBCL NOS / Immunoblastic	HIV, ulcerated tumor
15	80 / F	Alveolar ridge	EBV+ / DLBCL / Elderly / Polymorphous	Painful ulcer

Oral cases

EBV+, Epstein-Bar virus positive; DLBCL, diffuse large B-cell lymphoma; NOS, Not otherwise specified; IHC, immunohistochemistry; EBV, Epstein-Bar virus; NR, not reported.

Table 3 Dendritic cells between groups HL and DLBCL

	HL	DLBCL	
	Mean (SD)	Mean (SD)	p
CD1a	4.91 (1.23)	3.09 (0.43)	0.01
CD83	9.79 (5.41)	5.47 (1.64)	0.11
CD123	21.57 (2.46)	3.69 (1.96)	0.0003
CD207	4.17 (1.99)	1.73 (0.75)	0.01
FXIIIa	29.42 (3.65)	11.84 (1.14)	0.0003
S100	30.90 (1.26)	12.02 (0.78)	0.0003

Kruskal-Wallis One-Way ANOVA

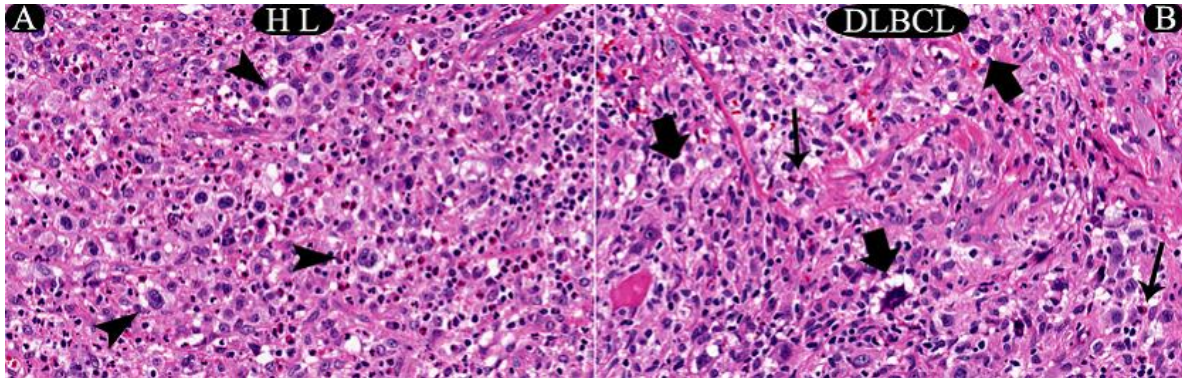


Fig. 1 .- Morphological characteristics of HL and oral DLBCL with HRS-like cells. (A) The classical diagnostic Hodgkin Reed-Sternberg (HRS) cell (Head arrow) is binucleate, each nucleus contains a prominent nucleolus giving the cell an “owl’s-eye” appearance, in a background of lymphocytes, plasma cells, histiocytes and eosinophils. (haematoxilina and eosin; original magnification x 400). (B) Morphological characteristics of oral DLBCL with HRS-cells-like (large arrow), some of this cells are morphologically similar to the cellular variants, lacunar and mummified of HL, within moderately sclerotic stroma and inflammatory milieu highlighting the eosinophil cells (thin arrows) (haematoxilina and eosin; original magnification x 400).

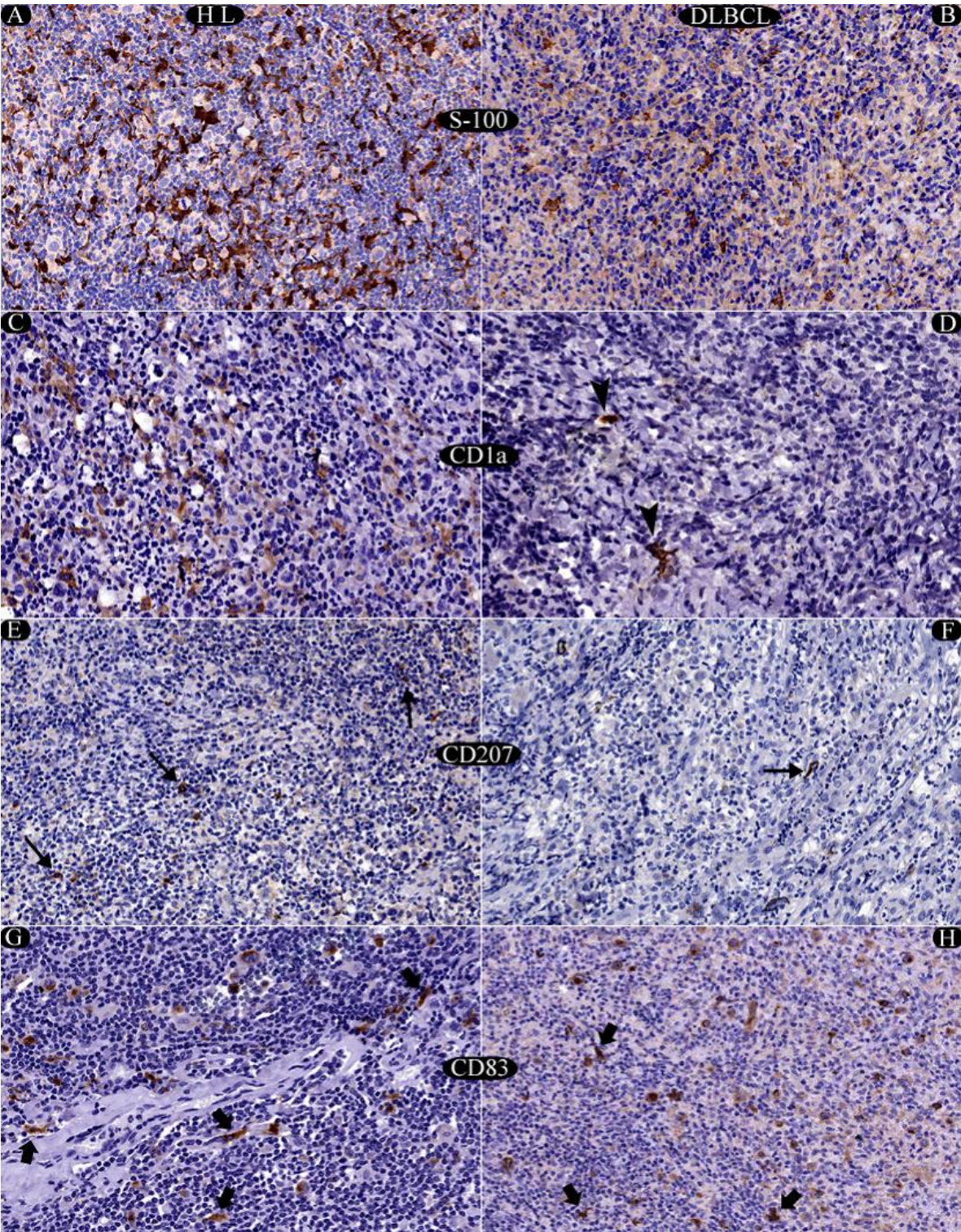


Fig. 2 .- Immunohistochemical findings of dendritic cells (DCs) in Hodgkin lymphoma (HL) and oral diffuse large B-cell lymphoma with Hodgkin/Reed-Sterberg-like cells (ODLBCL-HRS-like) (left and right column respectively). (A-B) S-100 antibody showed DCs with prominent long and slender dendrites. The immature DCs in both LH and ODLBCL-HRS-like, were identified through of CD1a (C-D) and CD207 (E-F), showing relatively shorter dendrites and distributed mainly in the intra-tumoral region. The mature DCs were identified with CD83 (G-H) and by the morphology, identifying CDs with dendritic extensions of varying sizes. All immunohistochemical images in original magnification x 200.

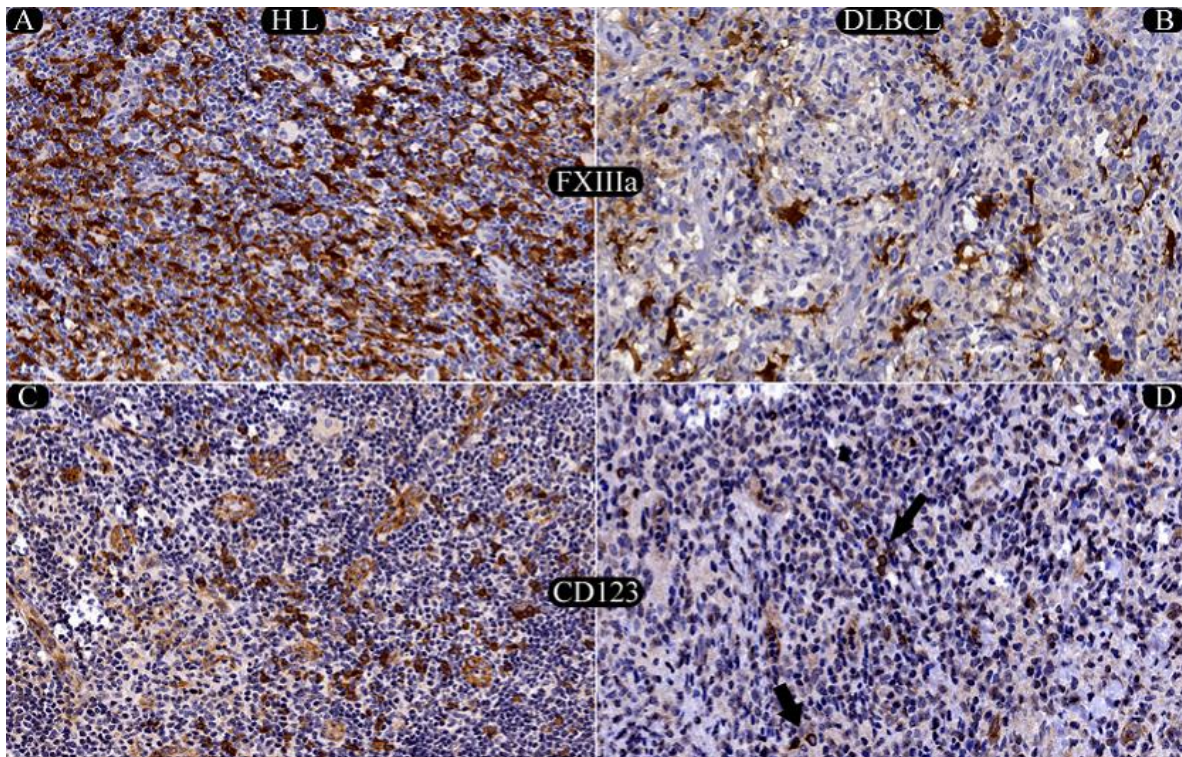


Fig. 3 .- Immunoperoxidase staining of Factor XIIIa and CD123 in HL and ODLBCL-HRS-like (left and right column respectively). (A-B) Factor XIIIa showed the prominent dendritic processes present in both entities with a smaller amount in the ODLBCL. CD123 in HL (C) were arranged in clusters, in close proximity of small venule, showing prominent CD123+ endothelial cells. These vessels exhibit close similarity with high endothelial venules of the lymph node. In ODLBCL (D) was observed loosely and scarce arranged cluster of CD123+.

CONCLUSÕES

- Os LDGCB-HRS-like da cavidade bucal devem ser incluídos no diagnóstico diferencial do LHC bucal. Ao se avaliar casos com células que morfológicamente lembrem as células HRS do LHC, é recomendável uma análise morfológica detalhada, bem como uma análise com amplo painel IQ para o diagnóstico correto.
- A angiogênese é essencial para o desenvolvimento de neoplasias hematolinfóides, Neste estudo observou-se aumento na angiogênese no LH assim como no LDGCB da cavidade bucal. Assim, a avaliação da angiogênese pode ser realizada através de qualquer um dos anticorpos, CD34, CD31 ou vWF. Em relação aos mastócitos, a presença deles junto a estruturas vasculares nos linfomas sugerem a participação no processo da angiogênese. Os resultados na literatura apontam a importância de se explorar as correlações dos parâmetros morfométricos em LH nodal e LDGCB da cavidade bucal, visto que há controvérsias entre os mesmos.
- A presença significativa de CD no LH e no LDGCB da cavidade bucal provavelmente desempenha um papel patologicamente relevante nestas neoplasias. Nossos resultados sugerem que o aumento no número de CD parece ser um fator contribuinte para a resposta imune estimulada pelo crescimento tumoral. Porém, compreender os mecanismos envolvidos na regulação de células dendríticas, proporcionará oportunidades adicionais para modificar o microambiente do tumor e melhorará a eficácia de diferentes abordagens terapêuticas para linfomas.

Referências

1. National Cancer Institute sponsored study of classifications of non-Hodgkin's lymphomas: summary and description of a working formulation for clinical usage. The Non-Hodgkin's Lymphoma Pathologic Classification Project. *Cancer*. 1982 May 15;49(10):2112-35.
2. Abramson JS, Shipp MA. Advances in the biology and therapy of diffuse large B-cell lymphoma: moving toward a molecularly targeted approach. *Blood*. 2005 Aug 15;106(4):1164-74.
3. Alacacioglu I, Ozcan MA, Ozkal S, Piskin O, Turgut N, Demirkan F, et al. Prognostic significance of immunohistochemical classification of diffuse large B-cell lymphoma. *Hematology*. 2009 Apr;14(2):84-9.
4. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*. 2000 Feb 3;403(6769):503-11.
5. Allemani C, Sant M, De Angelis R, Marcos-Gragera R, Coebergh JW. Hodgkin disease survival in Europe and the U.S.: prognostic significance of morphologic groups. *Cancer*. 2006 Jul 15;107(2):352-60.
6. Amen F, Horncastle D, Elderfield K, Banham AH, Bower M, Macdonald D, et al. Absence of cyclin-D2 and Bcl-2 expression within the germinal centre type of diffuse large B-cell lymphoma identifies a very good prognostic subgroup of patients. *Histopathology*. 2007 Jul;51(1):70-9.
7. Anagnostopoulos I, Hansmann ML, Franssila K, Harris M, Harris NL, Jaffe ES, et al. European Task Force on Lymphoma project on lymphocyte predominance Hodgkin disease: histologic and immunohistologic analysis of submitted cases reveals 2 types of Hodgkin disease with a nodular growth pattern and abundant lymphocytes. *Blood*. 2000 Sep 1;96(5):1889-99.
8. Arber D, Weiss L. CD15: a review. *Applied Immunohistochem*. 1993:17-30.
9. Asano N, Yamamoto K, Tamaru J, Oyama T, Ishida F, Ohshima K, et al. Age-related Epstein-Barr virus (EBV)-associated B-cell lymphoproliferative disorders: comparison with EBV-positive classic Hodgkin lymphoma in elderly patients. *Blood*. 2009 Mar 10;113(12):2629-36.
11. Ashton-Key M, Thorpe PA, Allen JP, Isaacson PG. Follicular Hodgkin's disease. *Am J Surg Pathol*. 1995 Nov;19(11):1294-9.
12. Au WY, Gascoyne RD, Gallagher RE, Le N, Klasa RD, Liang RH, et al. Hodgkin's lymphoma in Chinese migrants to British Columbia: a 25-year survey. *Ann Oncol*. 2004 Apr;15(4):626-30.
13. Banerjee D. Recent Advances in the Pathobiology of Hodgkin's Lymphoma: Potential Impact on Diagnostic, Predictive, and Therapeutic Strategies. *Adv Hematol*. 2011;2011:439456.
14. Basu D, Roy SK. Interfollicular Hodgkin's disease: an uncommon pattern that may cause diagnostic difficulty. *Indian J Pathol Microbiol*. 2006 Apr;49(2):221-5.
15. Bell D, Young JW, Banchereau J. Dendritic cells. *Adv Immunol*. 1999;72:255-324.
16. Ben-Yehuda-Salz D, Ben-Yehuda A, Polliack A, Ron N, Okon E. Syncytial variant of nodular sclerosing Hodgkin's disease. A new clinicopathologic entity. *Cancer*. 1990 Mar 1;65(5):1167-72.

17. Benharroch D, Meguerian-Bedoyan Z, Lamant L, Amin C, Brugieres L, Terrier-Lacombe MJ, et al. ALK-positive lymphoma: a single disease with a broad spectrum of morphology. *Blood*. 1998 Mar 15;91(6):2076-84.
18. Bianchini WA, Altemani AM, Paschoal JR. Undifferentiated head and neck tumors: the contribution of immunohistochemical technique to differential diagnosis. *Sao Paulo Med J*. 2003 Nov 6;121(6):244-7.
19. Biasoli I, Stamatoullas A, Meignin V, Delmer A, Reman O, Morschhauser F, et al. Nodular, lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma: a long-term study and analysis of transformation to diffuse large B-cell lymphoma in a cohort of 164 patients from the Adult Lymphoma Study Group. *Cancer*. 2010 Feb 1;116(3):631-9.
20. Bodoor K, Matalka I, Hayajneh R, Haddad Y, Gharaibeh W. Evaluation of BCL-6, CD10, CD138 and MUM-1 expression in diffuse large B-cell lymphoma patients: CD138 is a marker of poor prognosis. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2012;13(7):3037-46.
21. Boll B, Gorgen H, Fuchs M, Pluetschow A, Eich HT, Bargetzi MJ, et al. ABVD in Older Patients With Early-Stage Hodgkin Lymphoma Treated Within the German Hodgkin Study Group HD10 and HD11 Trials. *J Clin Oncol*. 2013 Mar 18.
22. Boudova L, Torlakovic E, Delabie J, Reimer P, Pfistner B, Wiedenmann S, et al. Nodular lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma with nodules resembling T-cell/histiocyte-rich B-cell lymphoma: differential diagnosis between nodular lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma and T-cell/histiocyte-rich B-cell lymphoma. *Blood*. 2003 Nov 15;102(10):3753-8.
23. Boulland ML, Kanavaros P, Wechsler J, Casiraghi O, Gaulard P. Cytotoxic protein expression in natural killer cell lymphomas and in alpha beta and gamma delta peripheral T-cell lymphomas. *J Pathol*. 1997 Dec;183(4):432-9.
24. Butler JJ. The histologic diagnosis of Hodgkin's disease. *Semin Diagn Pathol*. 1992 Nov;9(4):252-6.
25. Campana D, Thompson JS, Amlot P, Brown S, Janossy G. The cytoplasmic expression of CD3 antigens in normal and malignant cells of the T lymphoid lineage. *J Immunol*. 1987 Jan 15;138(2):648-55.
26. Carbone A, Gloghini A, Aiello A, Testi A, Cabras A. B-cell lymphomas with features intermediate between distinct pathologic entities. From pathogenesis to pathology. *Hum Pathol*. 2010 May;41(5):621-31.
27. Carbone A, Gloghini A, Volpe R. Paraffin section immunohistochemistry in the diagnosis of Hodgkin's disease and anaplastic large cell (CD30+) lymphomas. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*. 1992;420(6):527-32.
28. Cazals-Hatem D, Andre M, Mounier N, Copin MC, Divine M, Berger F, et al. Pathologic and clinical features of 77 Hodgkin's lymphoma patients treated in a lymphoma protocol (LNH87): a GELA study. *Am J Surg Pathol*. 2001 Mar;25(3):297-306.
29. Chang K, Arber D, Weiss L. CD30: a review. *Appl Immunohistochem* 1993;1:244.
30. Chi HS, Lee KW, Chiang FY, Tai CF, Wang LF, Yang SF, et al. Head and neck extranodal lymphoma in a single institute: a 17-year retrospective analysis. *Kaohsiung J Med Sci*. 2012 Aug;28(8):435-41.
31. Cho MS, Lee MK, Yang WI, Yoon JH. Granzyme B immunoreactivity in T/natural killer cell lymphomas. *Yonsei Med J*. 1997 Oct;38(5):285-93.

32. Chu PG, Arber DA. CD79: a review. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2001 Jun;9(2):97-106.
33. Coiffier B. Rituximab therapy in malignant lymphoma. *Oncogene*. 2007 May 28;26(25):3603-13.
34. Copie-Bergman C, Gaulard P, Maouche-Chretien L, Briere J, Haioun C, Alonso MA, et al. The MAL gene is expressed in primary mediastinal large B-cell lymphoma. *Blood*. 1999 Nov 15;94(10):3567-75.
35. Cotton DW, Stephenson TJ, Hird PM. Factor XIIIa positive cells in granulomatous lymph node lesions. *Histopathology*. 1990 May;16(5):513-4.
36. Dan J. *Neoplastic Hematopathology. Experimental and Clinical Approaches*. Judith E, Karp M, editors. New York, NY 20102010.
37. Davey FR, Elghetany MT, Kurec AS. Immunophenotyping of hematologic neoplasms in paraffin-embedded tissue sections. *Am J Clin Pathol*. 1990 Apr;93(4 Suppl 1):S17-26.
38. Davison GM. Dendritic cells, T-cells and their possible role in the treatment of leukaemia and lymphoma. *Transfus Apher Sci*. 2010 Apr;42(2):189-92.
39. de Leval L, Hasserjian RP. Diffuse large B-cell lymphomas and burkitt lymphoma. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2009 Aug;23(4):791-827.
40. Dejmek A, Brockstedt U, Hjerpe A. Optimization of a battery using nine immunocytochemical variables for distinguishing between epithelial mesothelioma and adenocarcinoma. *APMIS*. 1997 Nov;105(11):889-94.
41. Delsol G, Brousset P, Chittal S, Rigal-Huguet F. Correlation of the expression of Epstein-Barr virus latent membrane protein and in situ hybridization with biotinylated BamHI-W probes in Hodgkin's disease. *Am J Pathol*. 1992 Feb;140(2):247-53.
42. Delsol G, Gatter KC, Stein H, Erber WN, Pulford KA, Zinne K, et al. Human lymphoid cells express epithelial membrane antigen. Implications for diagnosis of human neoplasms. *Lancet*. 1984 Nov 17;2(8412):1124-9.
43. Derenzini E, Casadei B, Pellegrini C, Argnani L, Pileri S, Zinzani PL. Non-Hodgkin Lymphomas Presenting as Soft Tissue Masses: A Single Center Experience and Meta-analysis of the Published Series. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2012 Dec 12.
44. Desouki MM, Post GR, Cherry D, Lazarchick J. PAX-5: a valuable immunohistochemical marker in the differential diagnosis of lymphoid neoplasms. *Clin Med Res*. 2010 Jul;8(2):84-8.
45. DeYoung BR, Swanson PE, Argenyi ZB, Ritter JH, Fitzgibbon JF, Stahl DJ, et al. CD31 immunoreactivity in mesenchymal neoplasms of the skin and subcutis: report of 145 cases and review of putative immunohistologic markers of endothelial differentiation. *J Cutan Pathol*. 1995 Jun;22(3):215-22.
46. Diehl V, Engert A, Re D. New strategies for the treatment of advanced-stage Hodgkin's lymphoma. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2007 Oct;21(5):897-914.
47. Diehl V, Sextro M, Franklin J, Hansmann ML, Harris N, Jaffe E, et al. Clinical presentation, course, and prognostic factors in lymphocyte-predominant Hodgkin's disease and lymphocyte-rich classical Hodgkin's disease: report from the European Task Force on Lymphoma Project on Lymphocyte-Predominant Hodgkin's Disease. *J Clin Oncol*. 1999 Mar;17(3):776-83.
48. Diefenbach C, Steidl C. New strategies in hodgkin lymphoma: better risk profiling and novel treatments. *Clin Cancer Res*. Jun 1 2013;19(11):2797-2803.

49. Dojcinov SD, Venkataraman G, Raffeld M, Pittaluga S, Jaffe ES. EBV positive mucocutaneous ulcer--a study of 26 cases associated with various sources of immunosuppression. *Am J Surg Pathol*. 2010 Mar;34(3):405-17.
50. Dong HY, Browne P, Liu Z, Gangi M. PAX-5 is invariably expressed in B-cell lymphomas without plasma cell differentiation. *Histopathology*. 2008 Sep;53(3):278-87.
51. Eberle F, Jaffe E. XII. Gray zone lymphomas: a biological experiment, and a challenge for diagnosis and management. *Ann Oncol*. 2011 Jun;22(Suppl 4):iv64-iv6.
52. Eberle FC, Mani H, Jaffe ES. Histopathology of Hodgkin's lymphoma. *Cancer J*. 2009 Mar-Apr;15(2):129-37.
53. Engelhard M, Brittinger G, Huhn D, Gerhartz HH, Meusers P, Siegert W, et al. Subclassification of diffuse large B-cell lymphomas according to the Kiel classification: distinction of centroblastic and immunoblastic lymphomas is a significant prognostic risk factor. *Blood*. 1997 Apr 1;89(7):2291-7.
54. Falini B, Pileri S, Pizzolo G, Durkop H, Flenghi L, Stirpe F, et al. CD30 (Ki-1) molecule: a new cytokine receptor of the tumor necrosis factor receptor superfamily as a tool for diagnosis and immunotherapy. *Blood*. 1995 Jan 1;85(1):1-14.
55. Falini B, Pileri S, Stein H, Dieneman D, Dallenbach F, Delsol G, et al. Variable expression of leucocyte-common (CD45) antigen in CD30 (Ki1)-positive anaplastic large-cell lymphoma: implications for the differential diagnosis between lymphoid and nonlymphoid malignancies. *Hum Pathol*. 1990 Jun;21(6):624-9.
56. Fan Z, Natkunam Y, Bair E, Tibshirani R, Warnke RA. Characterization of variant patterns of nodular lymphocyte predominant hodgkin lymphoma with immunohistologic and clinical correlation. *Am J Surg Pathol*. 2003 Oct;27(10):1346-56.
57. Ferreira JM, Klumb CE, de Souza Reis R, de Oliveira Santos M, Oliveira JF, de Camargo B, et al. Lymphoma subtype incidence rates in children and adolescents: first report from Brazil. *Cancer Epidemiol*. 2012 Aug;36(4):e221-6.
58. Filippa DA, Ladanyi M, Wollner N, Straus DJ, O'Brien JP, Portlock C, et al. CD30 (Ki-1)-positive malignant lymphomas: clinical, immunophenotypic, histologic, and genetic characteristics and differences with Hodgkin's disease. *Blood*. 1996 Apr 1;87(7):2905-17.
59. Foss HD, Reusch R, Demel G, Lenz G, Anagnostopoulos I, Hummel M, et al. Frequent expression of the B-cell-specific activator protein in Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin's disease provides further evidence for its B-cell origin. *Blood*. 1999 Nov 1;94(9):3108-13.
60. Fraga M, Sanchez-Verde L, Forteza J, Garcia-Rivero A, Piris MA. T-cell/histiocyte-rich large B-cell lymphoma is a disseminated aggressive neoplasm: differential diagnosis from Hodgkin's lymphoma. *Histopathology*. 2002 Sep;41(3):216-29.
61. Gaidano G, Carbone A. MUM1: a step ahead toward the understanding of lymphoma histogenesis. *Leukemia*. 2000 Apr;14(4):563-6.
62. Garnache-Ottou F, Feuillard J, Ferrand C, Biichle S, Trimoreau F, Seilles E, et al. Extended diagnostic criteria for plasmacytoid dendritic cell leukaemia. *Br J Haematol*. 2009 Jun;145(5):624-36.
63. Gobbi PG, Ferreri AJ, Ponzoni M, Levis A. Hodgkin lymphoma. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2013 Feb;85(2):216-37.

64. Gonzalez CL, Medeiros LJ, Jaffe ES. Composite lymphoma. A clinicopathologic analysis of nine patients with Hodgkin's disease and B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Am J Clin Pathol*. 1991 Jul;96(1):81-9.
65. Good DJ, Gascoyne RD. Atypical lymphoid hyperplasia mimicking lymphoma. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2009 Aug;23(4):729-45.
66. Gorczyca W, Tsang P, Liu Z, Wu CD, Dong HY, Goldstein M, et al. CD30-positive T-cell lymphomas co-expressing CD15: an immunohistochemical analysis. *Int J Oncol*. 2003 Feb;22(2):319-24.
67. Greiner TC, Gascoyne RD, Anderson ME, Kingma DW, Adomat SA, Said J, et al. Nodular lymphocyte-predominant Hodgkin's disease associated with large-cell lymphoma: analysis of Ig gene rearrangements by V-J polymerase chain reaction. *Blood*. 1996 Jul 15;88(2):657-66.
68. Guermazi A, Brice P, de Kerviler EE, Ferme C, Hennequin C, Meignin V, et al. Extranodal Hodgkin disease: spectrum of disease. *Radiographics*. 2001 Jan-Feb;21(1):161-79.
69. Gulley ML, Glaser SL, Craig FE, Borowitz M, Mann RB, Shema SJ, et al. Guidelines for interpreting EBER in situ hybridization and LMP1 immunohistochemical tests for detecting Epstein-Barr virus in Hodgkin lymphoma. *Am J Clin Pathol*. 2002 Feb;117(2):259-67.
70. Hall GW, Katzilakis N, Pinkerton CR, Nicolin G, Ashley S, McCarthy K, et al. Outcome of children with nodular lymphocyte predominant Hodgkin lymphoma - a Children's Cancer and Leukaemia Group report. *Br J Haematol*. 2007 Sep;138(6):761-8.
71. Hameed A, Olsen KJ, Cheng L, Fox WM, 3rd, Hruban RH, Podack ER. Immunohistochemical identification of cytotoxic lymphocytes using human perforin monoclonal antibody. *Am J Pathol*. 1992 May;140(5):1025-30.
72. Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, Gascoyne RD, Delabie J, Ott G, et al. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood*. 2004 Jan 1;103(1):275-82.
73. Haralambieva E, Pulford KA, Lamant L, Pileri S, Roncador G, Gatter KC, et al. Anaplastic large-cell lymphomas of B-cell phenotype are anaplastic lymphoma kinase (ALK) negative and belong to the spectrum of diffuse large B-cell lymphomas. *Br J Haematol*. 2000 Jun;109(3):584-91.
74. Hards K, Becker GL, Hammamy MZ, Steinmetzer T. Design, synthesis, and characterization of chromogenic substrates of coagulation factor XIIIa. *Anal Biochem*. 2012 Sep 1;428(1):73-80.
75. Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink HK, Vardiman J, et al. The World Health Organization classification of neoplastic diseases of the haematopoietic and lymphoid tissues: Report of the Clinical Advisory Committee Meeting, Airlie House, Virginia, November 1997. *Histopathology*. 2000 Jan;36(1):69-86.
76. Hasserjian RP, Ott G, Elenitoba-Johnson KS, Balague-Ponz O, de Jong D, de Leval L. Commentary on the WHO classification of tumors of lymphoid tissues (2008): "Gray zone" lymphomas overlapping with Burkitt lymphoma or classical Hodgkin lymphoma. *J Hematop*. 2009 Jul;2(2):89-95.
77. Hendrickx A, Bossuyt X. Quantification of the leukocyte common antigen (CD45) in mature B-cell malignancies. *Cytometry*. 2001 Dec 15;46(6):336-9.

78. Higgins RA, Blankenship JE, Kinney MC. Application of immunohistochemistry in the diagnosis of non-Hodgkin and Hodgkin lymphoma. *Arch Pathol Lab Med*. 2008 Mar;132(3):441-61.
79. Hjalgrim H. On the aetiology of Hodgkin lymphoma. *Dan Med J*. 2012 Jul;59(7):B4485.
80. Hock BD, Kato M, McKenzie JL, Hart DN. A soluble form of CD83 is released from activated dendritic cells and B lymphocytes, and is detectable in normal human sera. *Int Immunol*. 2001 Jul;13(7):959-67.
81. Hodgkin. On some Morbid Appearances of the Absorbent Glands and Spleen. *Med Chir Trans*. 1832;17:68-114.
82. Hoeller S, Copie-Bergman C. Grey zone lymphomas: lymphomas with intermediate features. *Adv Hematol*. 2012;2012:460801.
83. Hoeller S, Zihler D, Zlobec I, Obermann EC, Pileri SA, Dirnhofer S, et al. BOB.1, CD79a and cyclin E are the most appropriate markers to discriminate classical Hodgkin's lymphoma from primary mediastinal large B-cell lymphoma. *Histopathology*. 2010 Jan;56(2):217-28.
84. Horna P, Olteanu H, Kroft SH, Harrington AM. Flow cytometric analysis of surface light chain expression patterns in B-cell lymphomas using monoclonal and polyclonal antibodies. *Am J Clin Pathol*. 2011 Dec;136(6):954-9.
85. Howlader N, Noone A, Krapcho M, Neyman N, Aminou R, Altekruse S, et al. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2009 (Vintage 2009 Populations), National Cancer Institute. National Cancer Institute at the National Institutes of Health [serial on the Internet]. 2009: Available from: http://seer.cancer.gov/csr/1975_2009_pops09/.
86. Iida S, Rao PH, Butler M, Corradini P, Boccadoro M, Klein B, et al. Dereglulation of MUM1/IRF4 by chromosomal translocation in multiple myeloma. *Nat Genet*. 1997 Oct;17(2):226-30.
87. Ilg EC, Schafer BW, Heizmann CW. Expression pattern of S100 calcium-binding proteins in human tumors. *Int J Cancer*. 1996 Nov 4;68(3):325-32.
88. Iqbal J, Meyer PN, Smith LM, Johnson NA, Vose JM, Greiner TC, et al. BCL2 predicts survival in germinal center B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma treated with CHOP-like therapy and rituximab. *Clin Cancer Res*. 2011 Dec 15;17(24):7785-95.
89. Jaffe ES. Anaplastic large cell lymphoma: the shifting sands of diagnostic hematopathology. *Mod Pathol*. 2001 Mar;14(3):219-28.
90. Jaffe ES, Pittaluga S. Aggressive B-cell lymphomas: a review of new and old entities in the WHO classification. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2011;2011:506-14.
91. Jalava P, Kuopio T, Juntti-Patinen L, Kotkansalo T, Kronqvist P, Collan Y. Ki67 immunohistochemistry: a valuable marker in prognostication but with a risk of misclassification: proliferation subgroups formed based on Ki67 immunoreactivity and standardized mitotic index. *Histopathology*. 2006 May;48(6):674-82.
92. Jarrett RF, MacKenzie J. Epstein-Barr virus and other candidate viruses in the pathogenesis of Hodgkin's disease. *Semin Hematol*. 1999 Jul;36(3):260-9.
93. Jayakumar A, Tai MH, Huang WY, al-Feel W, Hsu M, Abu-Elheiga L, et al. Human fatty acid synthase: properties and molecular cloning. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Sep 12;92(19):8695-9.

94. Kanavaros P, Stefanaki K, Vlachonikolis J, Eliopoulos G, Kakolyris S, Rontogianni D, et al. Expression of p53, p21/waf1, bcl-2, bax, Rb and Ki67 proteins in Hodgkin's lymphomas. *Histol Histopathol.* 2000 Apr;15(2):445-53.
95. Karanikas M, Machairiotis N, Zarogoulidis P, Stylianaki A, Corcoutsakis N, Mitrakas A, et al. Non-Hodgkin lymphoma and GIST: molecular pathways and clinical expressions. *Onco Targets Ther.* 2012;5:433-8.
96. Khoury JD, Jones D, Yared MA, Manning JT, Jr., Abruzzo LV, Hagemester FB, et al. Bone marrow involvement in patients with nodular lymphocyte predominant Hodgkin lymphoma. *Am J Surg Pathol.* 2004 Apr;28(4):489-95.
97. Korkolopoulou P, Cordell J, Jones M, Kaklamanis L, Tsenga A, Gatter KC, et al. The expression of the B-cell marker mb-1 (CD79a) in Hodgkin's disease. *Histopathology.* 1994 Jun;24(6):511-5.
98. Kramer MH, Hermans J, Wijburg E, Philippo K, Geelen E, van Krieken JH, et al. Clinical relevance of BCL2, BCL6, and MYC rearrangements in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood.* 1998 Nov 1;92(9):3152-62.
99. Krenacs L, Himmelmann AW, Quintanilla-Martinez L, Fest T, Riva A, Wellmann A, et al. Transcription factor B-cell-specific activator protein (BSAP) is differentially expressed in B cells and in subsets of B-cell lymphomas. *Blood.* 1998 Aug 15;92(4):1308-16.
100. Krishnan C, Warnke RA, Arber DA, Natkunam Y. PD-1 expression in T-cell lymphomas and reactive lymphoid entities: potential overlap in staining patterns between lymphoma and viral lymphadenitis. *Am J Surg Pathol.* 2010 Feb;34(2):178-89.
101. Kummer JA, Kamp AM, Tadema TM, Vos W, Meijer CJ, Hack CE. Localization and identification of granzymes A and B-expressing cells in normal human lymphoid tissue and peripheral blood. *Clin Exp Immunol.* 1995 Apr;100(1):164-72.
102. Kuppers R, Engert A, Hansmann ML. Hodgkin lymphoma. *J Clin Invest.* 2012 Oct 1;122(10):3439-47.
103. Kuppers R, Hansmann ML. The Hodgkin and Reed/Sternberg cell. *Int J Biochem Cell Biol.* 2005 Mar;37(3):511-7.
104. Kuppers R, Rajewsky K, Zhao M, Simons G, Laumann R, Fischer R, et al. Hodgkin disease: Hodgkin and Reed-Sternberg cells picked from histological sections show clonal immunoglobulin gene rearrangements and appear to be derived from B cells at various stages of development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Nov 8;91(23):10962-6.
105. Lau SK, Chu PG, Weiss LM. Immunohistochemical expression of Langerin in Langerhans cell histiocytosis and non-Langerhans cell histiocytic disorders. *Am J Surg Pathol.* 2008 Apr;32(4):615-9.
106. Lee AI, LaCasce AS. Nodular lymphocyte predominant Hodgkin lymphoma. *Oncologist.* 2009 Jul;14(7):739-51.
107. Lennert K. Morphology and classification of malignant lymphomas and so-called reticuloses. *Acta Neuropathol Suppl.* 1975;Suppl 6:1-16.
108. Lenting PJ, Casari C, Christophe OD, Denis CV. von Willebrand factor: the old, the new and the unknown. *J Thromb Haemost.* 2012 Dec;10(12):2428-37.
109. Lichtenheld MG, Olsen KJ, Lu P, Lowrey DM, Hameed A, Hengartner H, et al. Structure and function of human perforin. *Nature.* 1988 Sep 29;335(6189):448-51.

110. Lim MS, Beaty M, Sorbara L, Cheng RZ, Pittaluga S, Raffeld M, et al. T-cell/histiocyte-rich large B-cell lymphoma: a heterogeneous entity with derivation from germinal center B cells. *Am J Surg Pathol.* 2002 Nov;26(11):1458-66.
111. Lindboe CF, Torp SH. Comparison of Ki-67 equivalent antibodies. *J Clin Pathol.* 2002 Jun;55(6):467-71.
112. Llanos M, Alvarez-Arguelles H, Aleman R, Oramas J, Diaz-Flores L, Batista N. Prognostic significance of Ki-67 nuclear proliferative antigen, bcl-2 protein, and p53 expression in follicular and diffuse large B-cell lymphoma. *Med Oncol.* 2001;18(1):15-22.
113. Loddenkemper C, Anagnostopoulos I, Hummel M, Johrens-Leder K, Foss HD, Jundt F, et al. Differential Emu enhancer activity and expression of BOB.1/OBF.1, Oct2, PU.1, and immunoglobulin in reactive B-cell populations, B-cell non-Hodgkin lymphomas, and Hodgkin lymphomas. *J Pathol.* 2004 Jan;202(1):60-9.
114. Lukes RJ, Collins RD. Immunologic characterization of human malignant lymphomas. *Cancer.* 1974 Oct;34(4 Suppl):suppl:1488-503.
115. Mangi MH, Newland AC. Angiogenesis and angiogenic mediators in haematological malignancies. *Br J Haematol.* 2000 Oct;111(1):43-51.
116. Mani H, Jaffe ES. Hodgkin lymphoma: an update on its biology with new insights into classification. *Clin Lymphoma Myeloma.* 2009 Jun;9(3):206-16.
117. Marafioti T, Hummel M, Foss HD, Laumen H, Korbjuhn P, Anagnostopoulos I, et al. Hodgkin and reed-sternberg cells represent an expansion of a single clone originating from a germinal center B-cell with functional immunoglobulin gene rearrangements but defective immunoglobulin transcription. *Blood.* 2000 Feb 15;95(4):1443-50.
118. Marques M, Luz E, Hummel M, Vieira M, Bahia RC, Oliveira MC, et al. Prognostic Biomarkers and EBV Infection Research in Diffuse Large B-Cell Lymphoma of the Palatine Tonsils. *ISRN Oncol.* 2012;2012:652682.
119. Mason DY, Banks PM, Chan J, Cleary ML, Delsol G, de Wolf Peeters C, et al. Nodular lymphocyte predominance Hodgkin's disease. A distinct clinicopathological entity. *Am J Surg Pathol.* 1994 May;18(5):526-30.
120. McLellan AD, Heiser A, Sorg RV, Fearnley DB, Hart DN. Dermal dendritic cells associated with T lymphocytes in normal human skin display an activated phenotype. *J Invest Dermatol.* 1998 Nov;111(5):841-9.
121. Mesquita RA, de Araujo VC, Paes RA, Nunes FD, de Souza SC. Immunohistochemical analysis for CD21, CD35, Caldesmon and S100 protein on dendritic cells types in oral lymphomas. *J Appl Oral Sci.* 2009 May-Jun;17(3):248-53.
122. Mirra M, Falconieri G, Zanonati F, Di Bonito L. Inflammatory fibrosarcoma: another imitator of Hodgkin's disease? *Pathol Res Pract.* 1996 May;192(5):474-8; discussion 9-82.
123. Moretti S, Lanza F, Dabusti M, Tieghi A, Campioni D, Dominici M, et al. CD123 (interleukin 3 receptor alpha chain). *J Biol Regul Homeost Agents.* 2001 Jan-Mar;15(1):98-100.
124. Morton LM, Wang SS, Devesa SS, Hartge P, Weisenburger DD, Linet MS. Lymphoma incidence patterns by WHO subtype in the United States, 1992-2001. *Blood.* 2006 Jan 1;107(1):265-76.
125. Muris JJ, Meijer CJ, Vos W, van Krieken JH, Jiwa NM, Ossenkoppele GJ, et al. Immunohistochemical profiling based on Bcl-2, CD10 and MUM1 expression improves

- risk stratification in patients with primary nodal diffuse large B cell lymphoma. *J Pathol.* 2006 Apr;208(5):714-23.
126. Nam-Cha SH, Montes-Moreno S, Salcedo MT, Sanjuan J, Garcia JF, Piris MA. Lymphocyte-rich classical Hodgkin's lymphoma: distinctive tumor and microenvironment markers. *Mod Pathol.* 2009 Aug;22(8):1006-15.
127. Nechushtan H. The complexity of the complicity of mast cells in cancer. *Int J Biochem Cell Biol.* 2010 May;42(5):551-4.
128. Nguyen DT, Diamond LW, Hansmann ML, Fischer R. Differential diagnosis of L26-positive, CD15-negative Hodgkin's disease and large B-cell lymphoma with a high content of reactive T-cells: a morphologic and immunohistochemical study. *Hematopathol Mol Hematol.* 1996;10(3):135-50.
129. Nguyen PL, Ma J, Chavarro JE, Freedman ML, Lis R, Fedele G, et al. Fatty acid synthase polymorphisms, tumor expression, body mass index, prostate cancer risk, and survival. *J Clin Oncol.* 2010 Sep 1;28(25):3958-64.
130. Niedobitek G, Young LS, Herbst H. Epstein-Barr virus infection and the pathogenesis of malignant lymphomas. *Cancer Surv.* 1997;30:143-62.
131. Nogova L, Rudiger T, Engert A. Biology, clinical course and management of nodular lymphocyte-predominant hodgkin lymphoma. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2006:266-72.
132. Norton AJ, Ramsay AD, Smith SH, Beverley PC, Isaacson PG. Monoclonal antibody (UCHL1) that recognises normal and neoplastic T cells in routinely fixed tissues. *J Clin Pathol.* 1986 Apr;39(4):399-405.
133. Ogwang MD, Zhao W, Ayers LW, Mbulaiteye SM. Accuracy of Burkitt lymphoma diagnosis in constrained pathology settings: importance to epidemiology. *Arch Pathol Lab Med.* 2011 Apr;135(4):445-50.
134. Ordonez NG. Podoplanin: a novel diagnostic immunohistochemical marker. *Adv Anat Pathol.* 2006 Mar;13(2):83-8.
135. Osborne BM, Uthman MO, Butler JJ, McLaughlin P. Differentiation of T-cell lymphoma from Hodgkin's disease. Mitotic rate and S-phase analysis. *Am J Clin Pathol.* 1990 Feb;93(2):227-32.
136. Oshlies I, Burkhardt B, Salaverria I, Rosenwald A, d'Amore ES, Szczepanowski M, et al. Clinical, pathological and genetic features of primary mediastinal large B-cell lymphomas and mediastinal gray zone lymphomas in children. *Haematologica.* 2011 Feb;96(2):262-8.
137. Oudejans JJ, Jiwa NM, Kummer JA, Ossenkoppele GJ, van Heerde P, Baars JW, et al. Activated cytotoxic T cells as prognostic marker in Hodgkin's disease. *Blood.* 1997 Feb 15;89(4):1376-82.
138. Park S, Lee J, Ko YH, Han A, Jun HJ, Lee SC, et al. The impact of Epstein-Barr virus status on clinical outcome in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood.* 2007 Aug 1;110(3):972-8.
139. Parums DV, Cordell JL, Micklem K, Heryet AR, Gatter KC, Mason DY. JC70: a new monoclonal antibody that detects vascular endothelium associated antigen on routinely processed tissue sections. *J Clin Pathol.* 1990 Sep;43(9):752-7.
140. Payne V, Kam PC. Mast cell tryptase: a review of its physiology and clinical significance. *Anaesthesia.* 2004 Jul;59(7):695-703.

141. Peitsch MC, Amiguet P, Guy R, Brunner J, Maizel JV, Jr., Tschopp J. Localization and molecular modelling of the membrane-inserted domain of the ninth component of human complement and perforin. *Mol Immunol*. 1990 Jul;27(7):589-602.
142. Pelstring RJ, Zellmer RB, Sulak LE, Banks PM, Clare N. Hodgkin's disease in association with human immunodeficiency virus infection. Pathologic and immunologic features. *Cancer*. 1991 Apr 1;67(7):1865-73.
143. Piccaluga PP, Agostinelli C, Gazzola A, Tripodo C, Bacci F, Sabattini E, et al. Pathobiology of hodgkin lymphoma. *Adv Hematol*. 2011;2011:920898.
144. Pierelli L, Bonanno G, Rutella S, Marone M, Scambia G, Leone G. CD105 (endoglin) expression on hematopoietic stem/progenitor cells. *Leuk Lymphoma*. 2001 Nov-Dec;42(6):1195-206.
145. Pileri S, Bocchia M, Baroni CD, Martelli M, Falini B, Sabattini E, et al. Anaplastic large cell lymphoma (CD30 +/-Ki-1+): results of a prospective clinico-pathological study of 69 cases. *Br J Haematol*. 1994 Mar;86(3):513-23.
146. Pileri SA, Ascani S, Sabattini E, Falini B. Peripheral T-cell lymphoma: a developing concept. *Ann Oncol*. 1998 Aug;9(8):797-801.
147. Pileri SA, Ascani S, Sabattini E, Fraternali-Orcioni G, Poggi S, Piccioli M, et al. The pathologist's view point. Part II --aggressive lymphomas. *Haematologica*. 2000 Dec;85(12):1308-21.
148. Pileri SA, Piccaluga A, Poggi S, Sabattini E, Piccaluga PP, De Vivo A, et al. Anaplastic large cell lymphoma: update of findings. *Leuk Lymphoma*. 1995 Jun;18(1-2):17-25.
149. Poppema S, Lai R, Visser L. Monoclonal antibody OPD4 is reactive with CD45RO, but differs from UCHL1 by the absence of monocyte reactivity. *Am J Pathol*. 1991 Oct;139(4):725-9.
150. Provencio M, Espana P, Millan I, Yebra M, Sanchez AC, de la Torre A, et al. Prognostic factors in Hodgkin's disease. *Leuk Lymphoma*. 2004 Jun;45(6):1133-9.
151. Quintanilla-Martinez L, Fend F. Mediastinal gray zone lymphoma. *Haematologica*. 2011 Apr;96(4):496-9.
152. Rappaport H. Tumors of the hematopoietic system. In: *Atlas of tumor pathology*. . Washington, DC: Armed Forces Institute; 1966.
153. Rassidakis GZ, Medeiros LJ, Viviani S, Bonfante V, Nadali GP, Vassilakopoulos TP, et al. CD20 expression in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin's disease: associations with presenting features and clinical outcome. *J Clin Oncol*. 2002 Mar 1;20(5):1278-87.
154. Re D, Kuppers R, Diehl V. Molecular pathogenesis of Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol*. 2005 Sep 10;23(26):6379-86.
155. Rosenwald A, Wright G, Chan WC, Connors JM, Campo E, Fisher RI, et al. The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med*. 2002 Jun 20;346(25):1937-47.
156. Rudiger T, Ott G, Ott MM, Muller-Deubert SM, Muller-Hermelink HK. Differential diagnosis between classic Hodgkin's lymphoma, T-cell-rich B-cell lymphoma, and paragranuloma by paraffin immunohistochemistry. *Am J Surg Pathol*. 1998 Oct;22(10):1184-91.

157. Ruiz M, Parsons C, Cole J. Characterization of HIV-Associated Hodgkin's Lymphoma in HIV-Infected Patients: A Single-Center Experience. *J Int Assoc Physicians AIDS Care (Chic)*. 2012 Jul-Aug;11(4):234-8.
158. Said JW. Immunodeficiency-related Hodgkin lymphoma and its mimics. *Adv Anat Pathol*. 2007 May;14(3):189-94.
159. Savage KJ, Ferreri AJ, Zinzani PL, Pileri SA. Peripheral T-cell lymphoma--not otherwise specified. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2011 Sep;79(3):321-9.
160. Schmuth M, Sidoroff A, Danner B, Topar G, Sepp NT. Reduced number of CD1a+ cells in cutaneous B-cell lymphoma. *Am J Clin Pathol*. 2001 Jul;116(1):72-8.
161. Schwering I, Brauninger A, Klein U, Jungnickel B, Tinguely M, Diehl V, et al. Loss of the B-lineage-specific gene expression program in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2003 Feb 15;101(4):1505-12.
162. Seitz V, Hummel M, Marafioti T, Anagnostopoulos I, Assaf C, Stein H. Detection of clonal T-cell receptor gamma-chain gene rearrangements in Reed-Sternberg cells of classic Hodgkin disease. *Blood*. 2000 May 15;95(10):3020-4.
163. Shankar A, Daw S. Nodular lymphocyte predominant Hodgkin lymphoma in children and adolescents--a comprehensive review of biology, clinical course and treatment options. *Br J Haematol*. 2012 Nov;159(3):288-98.
164. Shimabukuro-Vornhagen A, Haverkamp H, Engert A, Balleisen L, Majunke P, Heil G, et al. Lymphocyte-rich classical Hodgkin's lymphoma: clinical presentation and treatment outcome in 100 patients treated within German Hodgkin's Study Group trials. *J Clin Oncol*. 2005 Aug 20;23(24):5739-45.
165. Smith LB. Nodular lymphocyte predominant Hodgkin lymphoma: diagnostic pearls and pitfalls. *Arch Pathol Lab Med*. 2010 Oct;134(10):1434-9.
166. Summers TA, Jr., Rush W, Aguilera N, Lupton G. Cutaneous involvement in the lymphoepithelioid variant of peripheral T-cell lymphoma, unspecified (Lennert lymphoma). Report of a case and review of the literature. *J Cutan Pathol*. 2009 Oct;36 Suppl 1:25-30.
167. Torlakovic E, Tierens A, Dang HD, Delabie J. The transcription factor PU.1, necessary for B-cell development is expressed in lymphocyte predominance, but not classical Hodgkin's disease. *Am J Pathol*. 2001 Nov;159(5):1807-14.
168. Torlakovic E, Torlakovic G, Nguyen PL, Brunning RD, Delabie J. The value of anti-pax-5 immunostaining in routinely fixed and paraffin-embedded sections: a novel pan pre-B and B-cell marker. *Am J Surg Pathol*. 2002 Oct;26(10):1343-50.
169. Traverse-Glehen A, Pittaluga S, Gaulard P, Sorbara L, Alonso MA, Raffeld M, et al. Mediastinal gray zone lymphoma: the missing link between classic Hodgkin's lymphoma and mediastinal large B-cell lymphoma. *Am J Surg Pathol*. 2005 Nov;29(11):1411-21.
170. Tsai HK, Mauch PM. Nodular lymphocyte-predominant hodgkin lymphoma. *Semin Radiat Oncol*. 2007 Jul;17(3):184-9.
171. Tsimberidou AM, Keating MJ. Richter syndrome: biology, incidence, and therapeutic strategies. *Cancer*. 2005 Jan 15;103(2):216-28.
172. Tsuboi K, Iida S, Inagaki H, Kato M, Hayami Y, Hanamura I, et al. MUM1/IRF4 expression as a frequent event in mature lymphoid malignancies. *Leukemia*. 2000 Mar;14(3):449-56.
173. Tubiana M. Hodgkin's disease: historical perspective and clinical presentation. *Baillieres Clin Haematol*. 1996 Sep;9(3):503-30.

174. Tzankov A, Bourgau C, Kaiser A, Zimpfer A, Maurer R, Pileri SA, et al. Rare expression of T-cell markers in classical Hodgkin's lymphoma. *Mod Pathol*. 2005 Dec;18(12):1542-9.
175. Tzankov A, Dirnhofer S. Pathobiology of classical Hodgkin lymphoma. *Pathobiology*. 2006;73(3):107-25.
176. Tzankov A, Krugmann J, Fend F, Fischhofer M, Greil R, Dirnhofer S. Prognostic significance of CD20 expression in classical Hodgkin lymphoma: a clinicopathological study of 119 cases. *Clin Cancer Res*. 2003 Apr;9(4):1381-6.
177. Tzankov A, Zimpfer A, Pehrs AC, Lugli A, Went P, Maurer R, et al. Expression of B-cell markers in classical Hodgkin lymphoma: a tissue microarray analysis of 330 cases. *Mod Pathol*. 2003 Nov;16(11):1141-7.
178. Uherova P, Valdez R, Ross CW, Schnitzer B, Finn WG. Nodular lymphocyte predominant Hodgkin lymphoma. An immunophenotypic reappraisal based on a single-institution experience. *Am J Clin Pathol*. 2003 Feb;119(2):192-8.
179. Vadakara J, Pro B. Targeting CD30 in anaplastic large cell lymphoma. *Curr Hematol Malig Rep*. 2012 Dec;7(4):285-91.
180. Vassallo J, Brousset P, Knetch H, Lamant L, Odermatt B, Delsol G. Detection of Epstein-Barr virus in Hodgkin's disease. *Applied Immunohistochemistry* 1993;1:213-19.
181. Vasudev Rao T, Alkindi S, Pathare AV. Follicular dendritic cell hyperplasia in plasma cell variant of Castleman's disease with interfollicular Hodgkin's disease. *Pathol Res Pract*. 2007;203(6):479-84.
182. Venizelos ID, Tatsiou ZA, Mandala E. Primary cutaneous T-cell-rich B-cell lymphoma: a case report and literature review. *Acta Dermatovenerol Alp Panonica Adriat*. 2008 Dec;17(4):177-81.
183. Venkataraman G, Raffeld M, Pittaluga S, Jaffe ES. CD15-expressing nodular lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma. *Histopathology*. 2011 Apr;58(5):803-5.
184. Verdijk P, Dijkman R, Plasmeijer EI, Mulder AA, Zoutman WH, Mieke Mommaas A, et al. A lack of Birbeck granules in Langerhans cells is associated with a naturally occurring point mutation in the human Langerin gene. *J Invest Dermatol*. 2005 Apr;124(4):714-7.
185. Visco C, Tzankov A, Xu-Monette ZY, Miranda RN, Tai YC, Li Y, et al. Patients with diffuse large B cell lymphoma of germinal center origin with BCL2 translocations have poor outcome, irrespective of MYC status: a report from an International DLBCL rituximab-CHOP Consortium Program Study. *Haematologica*. 2012 Aug 28.
186. Weissman D, Li Y, Ananworanich J, Zhou LJ, Adelsberger J, Tedder TF, et al. Three populations of cells with dendritic morphology exist in peripheral blood, only one of which is infectable with human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Jan 31;92(3):826-30.
187. Wilks S. Cases of enlargement of the lymphatic glands and spleen (or Hodgkin's disease) with remarks. *Guy's Hosp Rep*. 1865;11:56-7.
188. Yamagata T, Nishida J, Tanaka S, Sakai R, Mitani K, Yoshida M, et al. A novel interferon regulatory factor family transcription factor, ICSAT/Pip/LSIRF, that negatively regulates the activity of interferon-regulated genes. *Mol Cell Biol*. 1996 Apr;16(4):1283-94.

189. Yamaguchi M, Seto M, Okamoto M, Ichinohasama R, Nakamura N, Yoshino T, et al. De novo CD5+ diffuse large B-cell lymphoma: a clinicopathologic study of 109 patients. *Blood*. 2002 Feb 1;99(3):815-21.
190. Yoon DH, Choi DR, Ahn HJ, Kim S, Lee DH, Kim SW, et al. Ki-67 expression as a prognostic factor in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with rituximab plus CHOP. *Eur J Haematol*. 2010 Aug;85(2):149-57.
191. Zhao XF. Pitfalls in diagnostic hematopathology -- Part II. *Int J Clin Exp Pathol*. 2009;3(1):39-46.
192. Zhou LJ, Tedder TF. Human blood dendritic cells selectively express CD83, a member of the immunoglobulin superfamily. *J Immunol*. 1995 Apr 15;154(8):3821-35.

Anexo 1 – Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP certifica que o projeto de pesquisa "**Células Hodgkin / Reed-Sternberg - like em linfoma difuso de grandes células B de boca: Estudo histopatológico, imunohistoquímico e de hibridização in situ**", protocolo nº 036/2012, dos pesquisadores Víctor Hugo Toral Rizo e Oslei Paes de Almeida, satisfaz as exigências do Conselho Nacional de Saúde - Ministério da Saúde para as [pesquisas](#) em seres humanos e foi aprovado por este comitê em 30/05/2012.

The Ethics Committee in Research of the School of Dentistry of Piracicaba - State University of Campinas, certify that the project "**Hodgkin/Reed-Sternberg-like cells in oral diffuse large B-cell lymphoma: Histopathological, immunohistochemical and in situ hybridization study**", [register](#) number 036/2012, of Víctor Hugo Toral Rizo and Oslei Paes de Almeida, comply with the recommendations of the National Health Council - Ministry of Health of Brazil for research in human subjects and therefore was approved by this committee at 05/30/2012.


Profa. Dra. Livia Maria Andaló Tenuta
Secretária
CEP/FOP/UNICAMP


Prof. Dr. Jacks Jorge Junior
Coordenador
CEP/FOP/UNICAMP

Nota: O título do protocolo aparece como fornecido pelos pesquisadores, sem qualquer edição.
Notice: The title of the project appears as provided by the authors, without editing.