

- ▶ Abstract
- ▶ PDF
- ▶ Comentarios
- ▶ Título
- ▶ Resumen
- ▶ Introducción
- ▶ Material
- ▶ Resultados
- ▶ Discusión
- ▶ Conclusiones
- ▶ Referencias
- ▶ Imágenes

PRESENCIA DE SECUENCIAS DE ADN DEL VIRUS DEL HERPES TIPO 8 EN PSEUDOTUMOR INFLAMATORIO PULMONAR.

José Javier Gómez-Román, Gonzalo Ocejo-Vinyals, Pablo Sánchez-Velasco, Emilia Hernández Nieto, Francisco Leyva-Cobián, José Fernando Val-Bernal.

Dpto. Anatomía Patológica y Servicio de Inmunología Clínica. Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. Instituto Nacional de la Salud. Santander, España.

IV-CVHAP 2001 COMUNICACIÓN-E - 035

Fecha recepción: 13/02/2001
Fecha publicación: 24/03/2001

Evaluación: Ver "Taller de Patología Broncopulmonar y Molecular"

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: El Tumor Miofibroblástico Inflamatorio (Pseudotumor Inflamatorio) (TMI) está compuesto de miofibroblastos, células plasmáticas y linfocitos fundamentalmente. Las citoquinas inflamatorias, y sobre todo la interleukina 6 (IL-6) están implicadas en su patogénesis probablemente. El Virus del Herpes tipo 8 (VHH-8) codifica por otro lado proteínas reguladoras del ciclo celular y factores proinflamatorios, entre ellos la IL-6.

MATERIAL Y MÉTODOS: Utilizamos una combinación de PCR tipo nested con varios controles negativos realizada por triplicado frente a regiones no solapadas, hibridación in situ e inmunotinción frente a ciclina D1 e Interleukina-6 en cinco casos de TMI pulmonar.

RESULTADOS: La PCR nested fue positiva en todos los casos, al igual que el Southern blot y la hibridación in situ. La tinción para IL-6 y Ciclina D1 fue positiva asimismo en todos los casos.

CONCLUSIÓN: Se demuestra la presencia de ADN procedente del Virus del Herpes tipo 8 en cinco casos de pseudotumor inflamatorio pulmonar. Existe una importante actividad de la citoquina IL-6 y una sobreexpresión de Ciclina D1 en los mismos casos. El Virus del Herpes tipo 8 podría tener un papel importante en el desarrollo de algunos pseudotumores inflamatorios.

Palabras clave: pulmón | pseudotumor inflamatorio | virus del herpes tipo 8 | PCR

IMAGENES



Fig. 3.

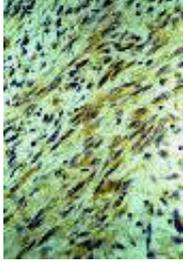


Fig. 4.

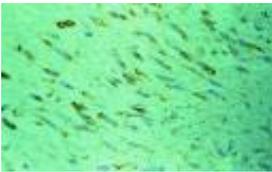


Fig. 5.

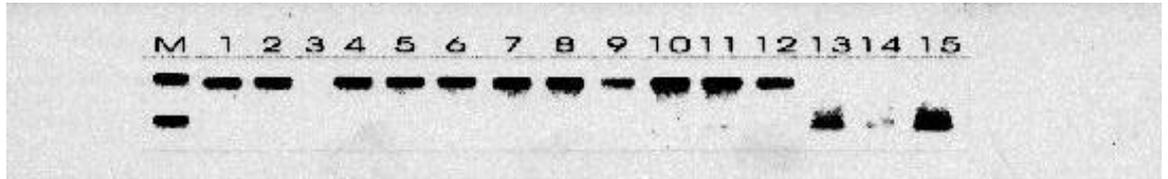


Figura 1

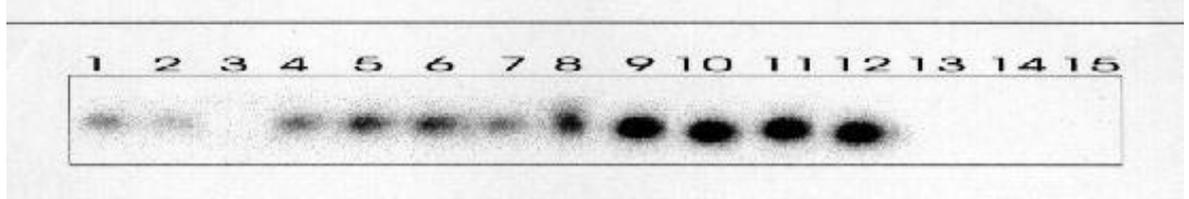


Figura 2

TABLA I

INTRODUCCIÓN

El Tumor Miofibroblástico Inflamatorio (TMI), también conocido como Pseudotumor inflamatorio es un tumor compuesto de células fusiformes miofibroblásticas acompañado de numerosas células plasmáticas y/o linfocitos (Weiss, 1994). El lugar originario donde se describió fue en el pulmón, aunque posteriormente se encontró en numerosas localizaciones. Existen numerosas incógnitas acerca de su patogénesis bien como un proceso reactivo de carácter exagerado o como una verdadera neoplasia. Clínicamente se suele presentar con un cortejo acompañante en forma de fiebre, sudoración nocturna, fatiga, pérdida de peso y adenomegalias, así como otras alteraciones en las pruebas de laboratorio, esto es hipergamaglobulinemia policlonal y aumento en la velocidad de sedimentación globular sugiriendo una posible causa autoinmune o infecciosa (Arber et al, 1998). Sin embargo, a pesar de estas sospechas, sólo de forma ocasional se han encontrado microorganismos bacterianos, fúngicos o virales asociados al TMI (Matsubara et al, 1988).

Por otro lado, recientemente se ha descrito un nuevo miembro de la familia de los gammaherpesvirus, llamado virus del herpes asociado al Sarcoma de Kaposi (VHSK) o Virus del Herpes humano tipo 8 (VHH8) en cerca del 95% de casos de Sarcoma de Kaposi (SK) de pacientes con o sin SIDA (Chang et al, 1994; Marchioli et al, 1996; Gómez-Román et al, 1999). Este virus es especial ya que su AND codifica para proteínas que simulan proteínas de señalización intercelular y reguladoras de ciclo celular como bcl-2, ciclina-D, factores reguladores de interferón e IL-6 (Cesarman and Knowles, 1997). Tales moléculas han sido implicadas en la patogénesis del SK, y de hecho IL-6 tiene una probada función en la proliferación de las células tumorales del SK asociado a SIDA, queratinocitos, células renales mesangiales, células musculares lisas y mioblastos (Kishimoto et al, 1992). Existe un consenso creciente acerca de que el VHH8 es el cofactor infeccioso necesario para todas las formas de SK (Lin et al, 1996), aunque debe ser dilucidado todavía el carácter transformante o permisivo del VHH8 en la tumorigénesis (Gallo, 1998).

Algunas comunicaciones han sugerido la importancia de IL-6 en el desarrollo del TMI (Coffin et

al, 1998), (Kishimoto et al, 1992). Sin embargo, hasta el momento no existían comunicaciones acerca de la posible relación entre VHH8 y el TMI. Describimos la presencia de secuencias de ADN de VHH8 y la sobreexpresión de citoquinas en cinco casos de TMI pulmonar

MATERIAL Y MÉTODOS

Descripción de los casos: Cinco casos de pseudotumor inflamatorio pulmonar fueron seleccionados de nuestros archivos del Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla en Santander (España). Los detalles epidemiológicos, de localización y de seguimiento están detallados en la Tabla 1. Todos los casos fueron revisados por dos patólogos de nuestra institución de forma ciega y sólo se aceptaron los casos que cumplieran los criterios de diagnóstico establecidos por la OMS (Weiss 1996). Se revisaron las historias clínicas de todos los pacientes y se recogieron todos los datos clínicos de interés. En todos los casos se llevó a cabo un seguimiento de al menos 6 meses tras la intervención.

En todos los casos, procedimos a la extracción de ADN a partir de material fijado en formol e incluido en parafina. Usamos el kit NucleoSpin C+T (Macherey-Nagel GmbH, Düren, Alemania). El ADN de cada espécimen fue obtenido en un laboratorio aislado del lugar donde se llevó a cabo la PCR. La amplificación se repitió hasta tres veces para asegurar la reproducibilidad de los resultados. Las muestras fueron analizadas de forma ciega. Se aplicaron condiciones de laboratorio estrictas y controles apropiados para evitar la aparición de contaminación y falsos resultados positivos. Todas las muestras fueron sometidas a una amplificación del exón 8 del gen inhibidor de C1 como control interno de calidad del ADN extraído.

Para la detección de ADN de VHH8 usamos un procedimiento de PCR-nested como ha sido descrito previamente (Moore 96), frente a una región de 571 bp en la reacción externa (sentido y antisentido, respectivamente) KS4 (5'-AGCACTCGCAGGGCAGTACG-3') y KS5 (5'-GACTCTTCGCTGATGAACTGG-3'). La amplificación de la región externa se llevó a cabo con las siguientes condiciones: Desnaturalización inicial: 94°C 2 min. Posteriormente 35 ciclos de 94°C 30 seg; 60°C 30 seg; 72°C 45 seg. Extensión final: 72°C 5 minutos. Se añadió 1 microlitro del producto de PCR a una mezcla de reacción interna que se amplificó durante 25 ciclos adicionales con primers frente a la región KS330233 de 233 pb KS1 (5'-AGCCGAAAGGATTCCACCAT-3') y KS2 (5'-TCCGTGTTGTCTACGTCCAG-3'). Las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador Perkin-Elmer 9600. Los productos de PCR se analizaron en gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio.

La confirmación de los resultados se llevó a cabo amplificando regiones no superpuestas de genes mayores de cápside como ha sido sugerido por otros autores (Moore 96). Los primers utilizados fueron: set no. 1 (externo sentido 5'-AGGCAACGTCAGATGTGAC-3', externo antisentido 5'-GAAATTACCCACGAGATCGC-3', interno sentido 5'-CATGGGAGTACATTGTCAGGACCTC-3', interno antisentido 5'-GGAATTATCTCGCAGGTTGCC-3') que generan un producto de PCR de 213 bp; set no 2 (externo sentido 5'-GGCGACATTCATCAACCTCAGG-3', externo antisentido 5'-ATATCATCCTGTGCGTTTCACGAC-3', interno sentido 5'-CGCATGGAGGACCTAGTCAATAAC-3', interno antisentido 5'-GGTTGTAGTCATTCTCGTCCAGGG-3') que generan un producto de PCR de 115 bp con las mismas condiciones que las señaladas anteriormente.

Los productos amplificados fueron transferidos a papel de nitrocelulosa y sometidos a hibridación con el método de Southern con una sonda de 25pb marcada con [32P]-trifosfato de deoxicitidina, representando una secuencia de pares de bases comprendida entre 1078 y 1102 (Chang et al 1994).

Hibridación in situ: Para la hibridación in situ se utilizó un fragmento de ADN de 115pb del ORF72 viral obtenido de un control tisular de un sarcoma de Kaposi. La generación de la sonda se realizó a partir de una PCR con los siguientes primers: P51 (5' primer; 5'-

CACCCTGAAACTCCAGGC-3') y P32(3'primer; 5'-GATCCGATCCTCACATAGCG-3') El producto de PCR fue purificado (CONCERT Rapid PCR purification System, Life Technologies, Barcelona, Spain) y analizado en electroforesis. El producto fue marcado con biotina (BioPrime DNA labelling System, Life Technologies) siguiendo las instrucciones del fabricante. La hibridación in situ se practicó sobre cortes histológicos de 5 μ m de espesor. Tras proceso de desparafinación y rehidratación, se bloqueó la actividad de peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno al 3%. Se incubaron las secciones en una solución de Proteinasa K (10 μ g/ml) a 37°C durante 30 minutos. La sonda se diluyó a una concentración de 0.1 μ g/ml en una solución de 10% vol/vol 20X SSC, 10% vol/vol solución de Denhardt, 2.5% salmon testes DNA (10 mg/ml), 50% vol/vol deionized formamide, 22.5% vol/vol agua destilada con 10% wt/vol sulfato de dextrano y 5% vol/vol tRNA. Se aplicaron 50 microlitros de dicha solución a las secciones y se calentaron en placa a 95°C. Posteriormente se incubaron a 37°C durante 16 horas en cámara húmeda. Posteriormente se realizaron varios lavados. Para visualizar la señal se utilizó un sistema de amplificación colorimétrica no isotópica con tiramida (DAKO GenPoint, DAKO Corporation) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Los controles positivos correspondieron a biopsias cutáneas de pacientes con Sarcoma de Kaposi. Los controles negativos a biopsias cutáneas de individuos sanos. La contratinción se realizó con hematoxilina de Harris

Inmunohistoquímica: Utilizamos los siguientes anticuerpos: IgG1 anti-recombinante IL-6 humana (Genzyme. USA. Monoclonal. Dilución 1/100) e IgG1 anti-Ciclina D1 humana (DCS-6 Dako Glostrup Denmark 1/100). Se usaron sobre tejido fijado en formol e incluido en parafina. IL-6 se incubó a 4°C toda la noche. Se utilizó recuperación antigénica mediante olla a presión y buffer citrato durante 90 segundos para IL-6 y 0,1mM EDTA pH8.0 para la CiclinaD1. Usamos el sistema de visualización EnVision™ + de Dako en un inmunoteñidor Techmate 500-220 (Biotek, Santa Barbara, CA) (Vyberg and Nielsen, 1998). Diaminobenzidina fue el cromógeno utilizado

RESULTADOS

Todos los casos fueron intervenidos quirúrgicamente con el diagnóstico de pseudotumor inflamatorio. Los tumores correspondieron con grandes masas blanquecinas con apariencia al menos focalmente arremolinada y consistencia firme. Microscópicamente estaban compuestos por células fusiformes miofibroblásticas positivas para Vimentina, Actina de músculo liso y negativas para marcadores epiteliales. En tres de los casos aparecían áreas ricas en células plasmáticas y linfocitos. No se apreciaron áreas de pleomorfismo, necrosis o figuras mitóticas atípicas. El seguimiento no reveló evidencia de recidiva tumoral en ningún caso.

Se detectaron las secuencias de VHH8 las tres ocasiones en las que se practicó la PCR (Figura 1). También se observó positividad en dos muestras de Sarcoma de Kaposi asociado a SIDA y Sarcoma de Kaposi pleural en un paciente con inmunosupresión. No se detectó amplificación en ninguno de los casos usados como controles negativos.

La hibridación por el método de Southern confirmó estos resultados (Figura 2). Las PCRs frente a las regiones no solapadas también resultaron positivas. La hibridación in situ mostró positividad en núcleos de células fusiformes en los cinco casos (Figura 3). La inmunohistoquímica reveló positividad para IL-6 humana en la mayor parte de las células miofibroblásticas, células endoteliales y población linfoide entremezclada (Figura 4). La CiclinaD1 humana mostró reactividad variable en los núcleos de los miofibroblastos en los cinco casos examinados (Figura 5).

La localización más frecuente del pseudotumor inflamatorio es el pulmón (Coffin et al, 1998). La aparición clínica puede ser de tipo insidioso o acompañarse de un cuadro con síndrome constitucional de fiebre, pérdida de peso y otras anomalías de laboratorio en un 15-30% de los casos. Estos hechos sugieren la posibilidad de que algunas citoquinas como la IL-6 pudieran estar involucradas en la patogénesis del TMI (Coffin et al, 1998).

El principal componente del TMI es la célula miofibroblástica. Éstas son células ubicuas y en cualquier situación en la que ocurre un daño tisular los fibroblastos se transforman en miofibroblastos. Esta situación está bajo el control de varias citoquinas y factores de crecimiento entre los que la IL-6 es uno de los más importantes (Kishimoto et al, 1992). Por otro lado, el TMI es una fuente importante de IL-6. Este hecho puede explicar también los niveles elevados de IL-6 e IL-1 β ; que se han hallado en sangre periférica y en tejido de un niño con un granuloma de células plasmáticas de pulmón (Rohrlich et al, 1995).

Algunos autores han tratado de identificar agentes infecciosos en el seno del TMI (Matsubara et al, 1988). De todos modos, el papel de un agente infeccioso o no, desencadenante podría estar restringido a los estadios iniciales de la enfermedad. Éste podría iniciar una cascada de reacciones paracrinas en las cuales las células estromales y el entorno inflamatorio pudieran sufrir un intercambio de factores proinflamatorios y proliferantes tras los cuales el tumor llegaría a ser autónomo. La producción de factores solubles a partir de esta cascada podría inducir las manifestaciones clínicas de la enfermedad (Matsubara et al, 1988). El VHH8 se ha detectado en el 95% de los casos de Sarcoma de Kaposi (SK) de pacientes asociado o no al SIDA (Chang et al, 1994; Marchioli et al, 1996) (Gómez-Román et al, 1999). Este virus ha sido relacionado además con el linfoma de cavidades, la enfermedad linfoproliferativa benigna, hiperplasia angioliñoide con eosinofilia, enfermedad de Castleman's multicéntrica, mieloma (Marchioli et al, 1992; Foreman et al, 1997) y sarcoidosis (DiAlberti et al, 1997). Existen asimismo casos aislados de detección de secuencias de ADN de VHH8 en pacientes sin inmunosupresión o SK (Memar et al, 1997; Trovato et al, 1999) aunque existe un acuerdo general de que los efectos patogénicos de VHH8 se potencian con la inmunosupresión. De forma llamativa VHH8 ha sido hallado en las regions interfoliculares de ganglios linfáticos hiperplásicos y en células endoteliales y neumocitos del pulmón en pacientes no inmunodeprimidos (Trovato et al, 1999). Ambas localizaciones estarían implicadas en el caso de los pseudotumores inflamatorios.

Se ha comunicado recientemente la secuencia de VHH8 (Russo et al, 1996). Se ha encontrado que el virus codifica homólogos de una gran variedad de genes celulares, como Ciclina D (Cesarman et al, 1997), e IL-6 (Moore et al, 1996). La IL-6 viral se ha demostrado como funcional en ensayos de proliferación y se expresa en células infectadas por VHH8 de estirpe hematopoyética y endotelial (Moore et al, 1996). Por otro lado, la IL-6 viral puede activar el receptor para la IL-6 humana (Wan et al, 1999), y puede iniciar una cascada de reacciones paracrinas que afectan IL-6 y otras citoquinas inflamatorias implicadas en la inhibición de la apoptosis (IL-6) y la transcripción de genes implicados en la síntesis de ADN (cyclin D). Aunque en esta comunicación no hemos practicado inmunotinción para IL-6 y ciclina D viral, hemos demostrado la presencia de IL-6 y ciclina D humana mediante anticuerpos monoclonales murinos. Se ha demostrado que un anticuerpo policlonal contra IL-6 viral no reacciona de forma cruzada con la IL-6 humana (Parravicini et al, 1997) no conocemos si los anticuerpos frente a la IL-6 humana reaccionan de forma cruzada con su homólogo viral.

El mecanismo oncogénico de VHH8 es desconocido hasta el momento. La mayoría de los genes reguladores de ciclo celular que son responsables de la tumorigénesis en otros virus del herpes son genes asociados a latencia (Ganem, 1997) y cualquiera que sea el mecanismo éste podría explicarse por una reactivación viral más que por una infección primaria lítica (Cesarman et al, 1997; Gilson and Ambinder, 1997). Como ocurre con otros virus de la familia del herpes, muchas situaciones asociadas como inmunosupresión, carga viral, coinfecciones y citoquinas proinflamatorias podrían

interaccionar en la patogénesis, morfología y agresividad biológica de las enfermedades asociadas con VHH8 (Chang et al, 2000). Por otro lado, la mayoría de los homólogos de citoquinas y factores antiapoptóticos se expresan durante el ciclo lítico viral. Por tanto, dicho ciclo lítico podría contribuir inicialmente a la patogénesis tumoral (Sun et al, 1999). Nuestros hallazgos en un tumor como el pseudotumor inflamatorio, caracterizado por un crecimiento autolimitado, con la presencia de partículas virales en muchas células tumorales y una sobreexpresión de citoquinas humanas en un entorno inflamatorio, probablemente favorecería una reactivación local de la replicación lítica de VHH8 que daría lugar a una neoplasia autónoma miofibroblástica.

CONCLUSIONES

En resumen, comunicamos la presencia de secuencias de ADN del virus del herpes humano tipo 8 en cinco casos de pseudotumor inflamatorio pulmonar. Existe además sobreexpresión de IL-6 y ciclina D humana en las células que conforman el pseudotumor inflamatorio. La IL-6 humana originada en las células miofibroblásticas e inflamatorias puede ser el factor responsable de los síntomas sistémicos presentes en algunos casos. Esta es la primera comunicación de la asociación de VHH8 con una neoplasia no linfóide en pacientes inmunocompetentes. El concepto de inmunosupresión como causa necesaria para tumorigénesis asociada a VHH8 debe revisarse.

NOTAS AL PIE DE PÁGINA

Correspondencia: José Javier Gómez-Román. Dpto. Anatomía Patológica y Servicio de Inmunología Clínica. Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. Instituto Nacional de la Salud. Santander, España. <mailto:apagrj@humv.es>

REFERENCIAS

1. Arber DA, Weiss LM, Chang KL (1998). Detection of Epstein-Barr Virus in Inflammatory Pseudotumor. *Sem Diagn Pathol* 15:155-60
2. Cesarman E, Knowles DM (1997). Kaposi's sarcoma-associated Herpesvirus: A lymphotropic human herpesvirus associated with Kaposi's sarcoma, Primary effusion lymphoma and multicentric Castleman's disease. *Sem Diagn Pathol* 14:54-66
3. Cesarman E, Nador RG, Bai F, Bohenzky RA, Russo JJ, Patrick S, Moore PS, Chang Y, and Knowles DM (1996). Kaposi's sarcoma associated herpesvirus contains G protein-coupled receptor and cyclin D homologs which are expressed in Kaposi's sarcoma and malignant lymphoma. *J Virology*, 70: 8218-8223
4. Coffin CM, Humphrey PA, Dehner LP (1998). Extrapulmonary Inflammatory Myofibroblastic Tumor: A clinical and pathological survey. *Sem Diagn Pathol* 15:85-101
5. Coffin CM, Dehner LP, Meis-Kindblom JM (1998). Inflammatory Myofibroblastic Tumor, Inflammatory Fibrosarcoma and related lesions: An historical review with different diagnostic considerations. *Sem Diagn Pathol* 15:102-10
6. Chang Y, Cesarman E, Pessin MS, Lee F, Culpepper J, Knowles DM, Moore PS (1994). Identification of herpesvirus-like sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Science* 266:1865-69
7. Chang J, Renne R, Dittmer D, Ganem D (2000). Inflammatory cytokines and the reactivation of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus lytic replication. *Virology* 266:17-25
8. DiAlberti L, Piatelli A, Artese L, Favia G, Patel S, Saunders N, Porter SR, Scully CM, Ngui SL,

- Teo CG (1997). Human herpesvirus 8 variants in sarcoid tissues. *Lancet* 350:1655-61
9. Foreman KE, Bacon PE, Hsi ED, Nickoloff BJ (1997). In situ polymerase chain reaction-based localization studies support role of human herpesvirus-8 as the cause of two AIDS-related neoplasms: Kaposi's sarcoma and body cavity lymphoma. *J Clin Invest* 99:2971-78
10. Gallo RC (1998). The enigmas of Kaposi's sarcoma. *Science* 282:1837-1839
11. Ganem D (1997). KSHV and Kaposi's sarcoma: The end of the beginning? *Cell* 91:157-160
12. Gilison ML, Ambinder RF (1997). Human herpesvirus-8. *Current Opinion in Oncology* 9:440-449
13. Gómez-Román JJ, Ocejo-Vinyals JG, Sánchez-Velasco P, Leyva-Cobián F, Val-Bernal JF (1999). Presence of Human Herpesvirus 8 DNA sequences in renal transplantation-associated pleural Kaposi's Sarcoma. *Arch Pathol Lab Med* 1999;123:1269-1273
14. Kishimoto T, Akira S, Taga T (1992). Interleukin-6 and its receptor: A paradigm for cytokines. *Science* 258:593-97
15. Lin BTY, Chen YY, Battifora H, and Weiss LM (1996). Absence of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-like DNA sequences in malignant vascular tumors of the serous membranes. *Mod Pathol* 9:1143-1146
16. Marchioli CC, Love JL, Abbott LZ, Huang YQ, Remick SC, Surtento-Reodica N, Hutchison RE, Mildvan D, Friedman-Kien AE, Poesz BJ (1996). Prevalence of Human Herpesvirus 8 DNA Sequences in several patient populations. *J Clin Microbiol* 34(10):2635-38
17. Matsubara O, Tan-Liu NS, Kenney RM, Mark EJ (1988). Inflammatory pseudotumors of the lung: Progression from organizing pneumonia to fibrous histiocytoma or to plasma cell granuloma in 32 cases. *Hum Pathol* 19:807-14
18. Memar OM, Rady PL, Goldblum RM, Tyring SK (1997). Human herpesvirus-8 DNA sequences in a patient with pemphigus vulgaris but without HIV infection or Kaposi's sarcoma. *J Invest Dermatol* 108(1):118-19
19. Moore PS, Kingsley LA, Holmberg SD, Spira T, Gupta P, Hoover DR, Parry JP, Conley LJ, Jaffe JW, Chang Y (1996). Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection prior to onset of Kaposi's sarcoma. *AIDS* 10:175-80
20. Moore PS, Boshoff C, Weiss R, Chang Y (1996). Molecular mimicry of human cytokine and cytokine response pathway genes by KSHV. *Science* 274:1739-44
21. Parravicini C, Corvbellino M, Paulli M, Magrini U, Lazzarino M, Moore PS, and Chang Y (1997). Expression of a virus-derived cytokine, KSHV vIL-6 in HIV-seronegative Castleman's disease. *Am J Pathol* 151:1517-1522.
22. Rohrlich P, Peuchmaur M, de Napoli S, Durand I, Garel C, Aigrain Y, Galanaud P, Vilmer E, Emilie D (1995). Interleukin-6 and Interleukin-1 β ; production in a pediatric plasma cell granuloma of the lung. *Am J Surg Pathol* 19:590-95
23. Russo JJ, Bohenzky RA, Chien MC, Chen J, Yan M, Maddalena D, Parry JP, Peruzzi D, Edelman IS, Chang Y, Moore PS (1996). Nucleotide sequence of the Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (HHV8). *Proc Natl Acad Sci USA* 93:14862-867
24. Sun R, Lin SF, Staskus K, Gradoville L, Grogan E, Haase A, Miller G (1999). Kinetics of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus gene expression. *J Virol* 73:2232-42
25. Trovato R, Luppi M, Barozzi P, Da Prato L, Maiorana A, Lico S, Marasca R, Torricelli P, Torelli G, Ceccherini-Nelli L (1999). Cellular localization of human herpesvirus 8 in nonneoplastic

lymphadenopathies and chronic interstitial pneumonitis by in situ polymerase chain reaction studies. *J Hum Virol* 2:38-44

26. Vyberg M, Nielsen S (1998). Dextran polymer conjugate two-step visualization system for immunohistochemistry. A comparison of EnVision plus with two three stepavidin-biotin techniques. *Appl Immunohistochem* 6:3-10

27. Wan X, Wang H, Nicholas J (1999). Human herpesvirus 8 interleukin-6 (vIL-6) signals through gp130 but has structural and receptor-binding properties distinct from those of human IL-6. *J Virol* 73:8268-78

28. Weiss SW (1994). *Histological typing of soft tissue tumors* (eds). New York, NY, Springer-Verlag, pp 48