



UNIVERSITAT^{DE}
BARCELONA

Síndromes Linfoproliferativos Asociados a Inmunodeficiencias Secundarias:

Papel de la Infección por Virus Herpes Oncogénicos y la Diferenciación Plasmocelular

Blanca González Farré



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement 3.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento 3.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution 3.0. Spain License.**



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

**Síndromes Linfoproliferativos Asociados a
Inmunodeficiencias Secundarias:
Papel de la Infección por Virus Herpes
Oncogénicos y la Diferenciación Plasmocelular**

Tesis Doctoral presentada por

Blanca González Farré

Para optar al grado de Doctora en Medicina

Blanca González

Doctoranda

Antonio Martínez

Tutor y Director

Elías Campo

Codirector

Facultat de Medicina

Departament d'Anatomia Patològica, Farmacologia i Microbiologia

Barcelona, 2017

Al meu pare

A posse ad esse

Agradecimientos

Aquesta tesi és el resultat d'un llarg camí, no sempre planer però globalment molt satisfactori, en el que directa o indirectament han participat moltes persones i a les que vull transmetre el meu més sincer agraïment.

En primer lloc al Toni, sin ti esto no hubiera sido posible. Gracias por confiar en mí y darme la oportunidad de entrar en el apasionante mundo de la hematopatología y de la investigación y por contagiarme tu entusiasmo y motivación. Gracias por responder siempre, aunque sea *in the last minute*... També a l'Elias, per tot, per ensenyar-me la rigorositat en el treball i de la feina ben feta. Gràcies per la teva confiança i per totes les oportunitats. Mai podré agrair suficient tot el que m'has aportat.

També gràcies al Lluís i l'Olga, per compartir amb mi el vostre coneixement i recolzar-me durant el meu aprenentatge.

Moltes gràcies Rami, vas ser una peça clau en la elecció de la plaça. Tot va començar aquell 19 de maig. Qui sap on hagués anat a parar si no m'hagués trobat amb el "jefe" entusiasta? vaig pensar que aquí hi estaria com a casa. I així ha estat.

Vull agrair també a tots els residents amb els qui he compartit aquests anys i que ho han fet tot més fàcil i sobretot molt entretingut. Alba, per ser un exemple a seguir. Dani, perquè sense el teu suport no se pas on seria. Gràcies per tot el que m'has ensenyat, per aplanar-me el camí i per no perdre la paciència (tot i que m'hi esforço). Gràcies per ajudar-me sempre i des de el primer moment. Vicky, Sofía, Paola, Leo, Malu, Ana Belén, Amaia, Adela, Iban, Laura, Jorge y Carla gracias por guiarme en la sala de inclusión, la sala de necros o el 10 cabezas. Hicisteis que los 4 años de residencia fueran una experiencia intensa y fascinante llena de buenos momentos que recordaré siempre. Gracias por vuestro soporte dentro y fuera del servicio.

Gràcies als rotants que han passat per juniors i amb els qui hem compartit, no només casos únics sinó també sopars i experiències. Especialment Davide, Mily i Marco porque os habéis convertido en un pieza importante de mi vida. Gràcies també, Sandra.

Infinitas gracias a “*los citos*”, está claro que sin el combo café-chocolate esto no hubiera sido posible. Gracias por dejar airearme, por dejar quejarme, por escucharme, gracias simplemente por dejarme estar.

Gràcies a tot el departament d’anatomia patològica, incloent els membres de l’escola, tècniques i administratives. Gràcies a tots els adjunts perquè m’heu ensenyat a gaudir de l’especialitat.

Gràcies als companys i amics del CEK, especialment a la Iti per transmetre’m energia sense límits i passió per la recerca. Gràcies per fer-me un forat i ensenyar-me un món apassionant.

També, com no, gràcies als de fora de l’hospital, als que m’heu donat i em doneu suport personal incondicional. Gràcies Marta i Paco, senzillament per ser el triangle que som. Gracias Rober porque te has convertido en más que un compañero de swing y tennis i, Maria gràcies per la teva honestedat i valentia. Gràcies Laura per haver-me aguantat les crisis varies i per ser com la meva germana a Barcelona. Gràcies a tots els que feu que la Gran Ciutat sigui com un poble.

Per últim i per sobre de tot, vull agrair a tota la meva família. Especialment, Xavi, Mario i Moni gràcies per tot, per saber que sempre estareu allí, pel “calor de hogar”.

Gràcies mare, perquè sóc com sóc gràcies a tu, per la manera com veus la vida, per tot el que has fet per mi. Gràcies pare per la teva rigorositat i responsabilitat davant de tot. Gràcies per estimar-me tant.

ÍNDICE

ACRÓNIMOS.....	15
INTRODUCCIÓN	17
1. SÍNDROMES LINFOPROLIFERATIVOS ASOCIADOS A INMUNODEFICIENCIAS SECUNDARIAS	19
1.1. Síndromes linfoproliferativos post-trasplante	20
1.1.1 Epidemiología.....	20
1.1.2 Patogénesis	21
1.1.3 Subtipos histológicos.....	23
1.1.4 Tratamiento.....	25
1.2 Síndromes linfoproliferativos asociados a la infección por HIV	29
1.2.1 Epidemiología y patogénesis.....	29
1.2.2 Subtipos histológicos.....	30
1.3 Síndromes linfoproliferativos asociados a inmunodeficiencias iatrogénicas.....	33
1.4 Síndromes linfoproliferativos asociados a la edad	34
2. VIRUS HERPES ONCOGÉNICOS	34
2.1 Virus de Epstein-Barr.....	35
2.1.1 Ciclo viral	35
2.1.2 Detección viral precoz en sangre periférica.....	40
2.1.3 Síndromes linfoproliferativos asociados al EBV	41
2.2 Virus herpes tipo 8 o virus del Sarcoma de Kaposi.....	42
2.2.1 Ciclo viral	42
2.2.2 Detección viral precoz en sangre periférica.....	45
2.2.3 Síndromes linfoproliferativos asociados a HHV8	45
3. DIFERENCIACIÓN PLASMOCELULAR Y ONCOGÉNESIS ASOCIADA A VIRUS HERPES	53
3.1. Mecanismos de diferenciación plasmocelular de las células B maduras.....	53
3.1.1 Diferenciación plasmocelular T independiente	53

3.1.2 Diferenciación plasmocelular T dependiente. Reacción de centro germinal	53
3.2. Papel de la diferenciación plasmocelular en la reactivación de la infección por virus oncogénicos.....	56
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	59
HIPÓTESIS DE TRABAJO	61
OBJETIVO GENERAL.....	63
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	63
Primer trabajo	63
Segundo trabajo	64
RESULTADOS	65
PRIMER TRABAJO.....	67
SEGUNDO TRABAJO.....	83
DISCUSIÓN	101
CONCLUSIONES	113
BIBLIOGRAFÍA.....	117

Acrónimos

ID: Inmunodeficiencia (del inglés, *immunodeficiency*)

WHO: Organización Mundial de la Salud (del inglés, *World Health Organization*)

HIV: Virus de la inmunodeficiencia humana (del inglés, *human immunodeficiency virus*)

ID-LPD: Síndrome linfoproliferativo asociado a inmunodeficiencia (del inglés, *immunodeficiency associated lymphoproliferative disorder*)

PTLD: Síndromes linfoproliferativos post-trasplante (del inglés, *post-transplant lymphoproliferative disorders*)

EBV: Virus de Epstein-Barr (del inglés, *Epstein-Barr virus*)

IPI: Índice pronóstico internacional (del inglés, *International Prognostic Index*)

DLBCL: Linfoma difuso de célula grande B (del inglés, *diffuse large B cell lymphoma*)

CTLs: Células T citotóxicas (del inglés, *cytotoxic T lymphocytes*)

cART: Terapia antirretroviral combinada (del inglés, *combination antiretroviral therapy*)

TFH: Células T de fenotipo folicular helper

HHV8: Virus herpes humano tipo 8 o virus del sarcoma de Kaposi (del inglés, *human herpes virus 8 o Kaposi sarcoma herpes virus*)

HL: Linfoma de Hodgkin (del inglés, *Hodgkin lymphoma*)

NOS: Sin otra especificación (del inglés, *not otherwise specified*)

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés, *polymerase chain reaction*)

MCD: Enfermedad de Castleman multicéntrica (del inglés, *multicentric Castleman disease*)

PEL: Linfoma primario de cavidades (del inglés, *primary effusion lymphoma*)

EBER: Hibridación *in situ* para el virus de Epstein-Barr (del inglés, *Epstein Barr-encoded RNA*)

EBNA: Antígeno nuclear del virus de Epstein-Barr (del inglés, *Epstein-Barr nuclear antigen*)

LMP: Proteína latente de membrana (del inglés, *latent membrane protein*)

BCR: Receptor de células B (del inglés, *B cell receptor*)

HHV8-LANA1: Antígeno de latencia nuclear 1 del virus herpes tipo 8 (del inglés, *latency-associated nuclear antigen 1*)

GLPD: Síndrome linfoproliferativo germinotrópico (del inglés, *germinotropic lymphoproliferative disorder*)

KICS: Síndrome inflamatorio por producción de citosinas asociado a la infección por virus del sarcoma de Kaposi (del inglés, *KSHV-associated inflammatory cytokine syndrome*)

RE: Retículo endoplasmático

ERE/UPR: Vía de estrés del retículo endoplasmático (del inglés, *unfolded protein response*)

HHV8-RH: Hiperplasia linfoide reactiva asociada a virus herpes tipo 8 (del inglés, *human herpes virus 8 associated reactive lymphoid hiperplasia*)

FDC: Células foliculares dendríticas (del inglés, *follicular dendritic cells*)

PBR-MCD: Enfermedad de Castleman rica en plasmablastos (del inglés, *plasmablast-rich-MCD*)

INTRODUCCIÓN

1. Síndromes linfoproliferativos asociados a inmunodeficiencias secundarias

Las inmunodeficiencias (ID) secundarias son un grupo dispar de enfermedades adquiridas en las que existe un déficit en el sistema inmunitario que conlleva un aumento de la susceptibilidad a padecer infecciones y una mayor prevalencia de neoplasias linfoides. Actualmente la Organización Mundial de la Salud (WHO) reconoce tres situaciones clínicas asociadas a ID con un riesgo incrementado de desarrollar linfomas: el estado post-trasplante, la infección por virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) y las inmunodeficiencias iatrogénicas. Aunque la etiología de la ID sea distinta existen evidencias que apoyan mecanismos moleculares patogénicos comunes en el desarrollo de los síndromes linfoproliferativos independientemente del tipo de ID subyacente.⁽¹⁾

Pese a que los síndromes linfoproliferativos asociados a inmunodeficiencias (ID-LPD) constituyen un grupo heterogéneo de enfermedades, tanto desde el punto de vista morfológico como clínico, estas lesiones comparten una serie de características comunes. Algunos de los hallazgos típicos de los ID-LPD son: proliferaciones linfocitarias de línea B con rasgos de diferenciación plasmocelular, frecuentemente asociadas a virus herpes oncogénicos que se presentan con afectación extranodal y marcada agresividad clínica.⁽²⁾ El diagnóstico morfológico y la clasificación de los ID-LPD es complicado, no solamente por su baja frecuencia sino también por la heterogeneidad propia de las lesiones y al solapamiento de algunas de sus características. Por eso, un diagnóstico preciso requiere una evaluación meticulosa de la morfología, inmunofenotipo, genotipo, status viral e historia clínica. El abordaje terapéutico es asimismo difícil. Por un lado, se debe controlar el déficit inmune del paciente y por otro se debe tratar la neoplasia. A pesar de que algunas de estas lesiones en estadios iniciales pueden regresar si se restablece la inmunidad,^(3,4) en función de las alteraciones genéticas adquiridas es posible que la modulación inmune ya no pueda revertir el proceso y acontezca la transformación neoplásica.^(5,6)

1.1. Síndromes linfoproliferativos post-trasplante

1.1.1 Epidemiología

Los síndromes linfoproliferativos post-trasplante (PTLD) son una complicación poco frecuente aunque bien reconocida tras el trasplante de órganos sólidos o de progenitores hematopoyéticos. Su incidencia aproximada se sitúa en alrededor del 2% si se consideran todos los órganos en general.⁽²⁾ Sin embargo, existen variaciones sustanciales en función del órgano trasplantado. Se estima un riesgo de 0.5-2.5% tras recibir un trasplante renal y del 5-20% en casos de trasplante intestinal y multivisceral.⁽²⁾ Además del órgano trasplantado, otros factores influyen en el desarrollo de los PTLD y uno de los más importantes es la seronegatividad para el virus de Epstein-Barr (EBV) en el momento del trasplante. Trasplantar un órgano de donante EBV-seropositivo a receptor seronegativo aumenta el riesgo de PTLD entre un 10 y un 75%⁽⁷⁾ además de explicar la mayor incidencia de PTLD en la población pediátrica.⁽⁸⁾ Aunque por el momento no es posible predecir qué pacientes trasplantados desarrollarán un PTLD, otros factores de riesgo son: la ausencia de exposición previa a la infección por citomegalovirus,⁽⁷⁾ el tipo de régimen inmunosupresor usado y factores intrínsecos del huésped como determinados polimorfismos que conllevan una expresión diferencial de citocinas pro o anti-inflamatorias.⁽⁹⁻¹¹⁾

La mayoría de los PTLD tras trasplante de órgano sólido se originan en las células del receptor, con excepción de aquellos casos que afectan exclusivamente al órgano trasplantado en cuyo caso el origen tiende a estar en los linfocitos del donante. Por el contrario, los casos tras trasplante de médula ósea se originan más frecuentemente en las células del donante.^(12,13)

La presentación clínica es también variable. Sin embargo, es frecuente la afectación extranodal y hasta en el 40-50% de los pacientes se presenta como enfermedad diseminada e IPI \geq 3.⁽¹⁴⁾ Aunque históricamente el 80% de los PTLD ocurrían en el primer año tras el trasplante, el tiempo entre la recepción del órgano y el desarrollo del linfoma ha variado en los últimos años debido al cambio en los

tratamientos inmunosupresores y probablemente a un mayor reconocimiento de los PTLD-EBV negativos.

1.1.2 Patogénesis

Hasta el 60-70% de los PTLD se asocian a infección por EBV.⁽¹⁵⁾ Sin embargo, existen también casos de PTLD-EBV negativos lo que sugiere que, si bien la infección viral es un mecanismo patogénico necesario en muchos casos, éste no es suficiente para el desarrollo de PTLD y que la progresión a linfoma requiere además la acumulación de distintos cambios genéticos. No se ha identificado una firma genética o molecular característica y específica de los PTLD para poderlos diferenciar de aquellos linfomas que se desarrollan sin el contexto de la inmunosupresión. Existen estudios que han demostrado que los PTLD tienen alteraciones genéticas comunes con aquellos linfomas originados en pacientes inmunocompetentes (alteraciones de *MYC*, *BCL6* y *BCL2* y pérdidas de *TP53*) pero, también se han descrito alteraciones propias como ganancias de 5p, pérdidas de 4q, 17q o Xp.^(16,17) Datos actuales sugieren que los PTLD-EBV negativos son más similares a los linfomas que se desarrollan en pacientes inmunocompetentes, mientras que los PTLD-EBV positivos guardarían más relación desde un punto de vista patogenético con otras proliferaciones linfoides relacionadas con el virus. En este sentido, se han descrito trisomías de los cromosomas 9 y 11 o ganancias en 9p24.1, que implican PD-L1, en casos de PTLD-EBV positivos de modo similar a otros linfomas asociados a infección viral.^(18,19) En los PTLD-EBV negativos se han observado ganancias de 3/3q y 18q o pérdidas de 6q23.3/*TNFAIP3* y 9p21/*CDKN2A*^(20,21) que se encuentran también en otros linfomas agresivos en pacientes inmunocompetentes. A pesar de estos datos, los trabajos de expresión génica realizados hasta el momento no han permitido concluir con certeza si los PTLD-EBV positivos y los PTLD-EBV negativos son enfermedades distintas y si estos últimos son similares a los que acontecen en la población general.^(20,22,23) Parece ser que podrían existir una serie de mecanismos iniciales comunes que contribuirían en la linfomagénesis de todos los PTLD como la depleción iatrogénica de células T, la

inestabilidad de microsatélites que conllevaría un acúmulo de mutaciones, alteraciones epigenéticas, hipermutación somática aberrante con acúmulo de mutaciones puntuales, o los propios polimorfismos del huésped y, en caso de existir infección viral activa, el virus activaría su maquinaria con el subsecuente desarrollo de los PTLD-EBV positivos. Si, por el contrario, no existe infección viral o ésta se controla mediante la inmunidad del huésped, la etiopatogenia de los PTLD-EBV negativos es todavía incierta (Figura 1).⁽²⁴⁾ Algunos casos se podrían explicar por la teoría del “hit-and-run”,⁽²⁵⁾ es decir proliferaciones linfoides inducidas por el virus pero que lo pierden en la transformación. También se postulan otras infecciones virales como agentes etiológicos⁽²⁶⁾ o en algunos casos por limitaciones técnicas o métodos de detección inadecuados podrían explicar la ausencia de detección del virus.

En las páginas 36-40 se desarrolla con más detalle el mecanismo patogénico de las lesiones asociadas a la infección viral.

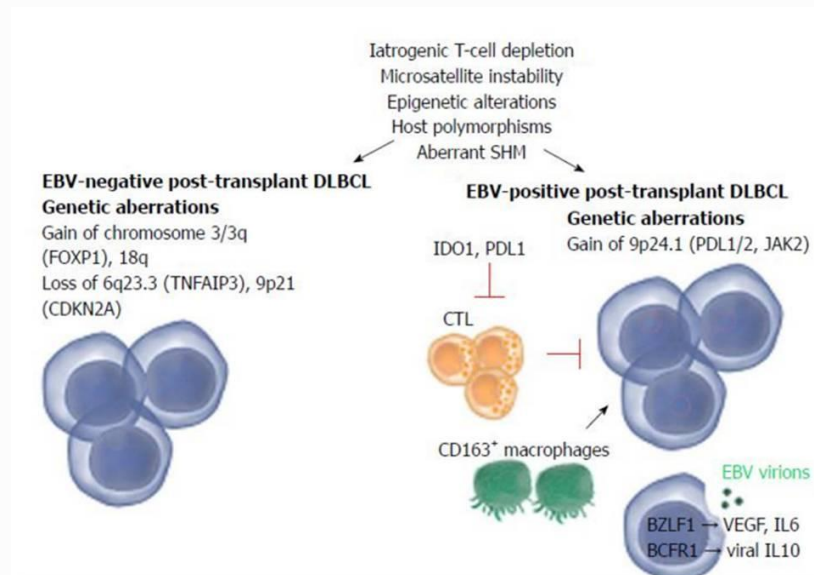


Figura 1: Mecanismos patogénicos comunes y diferentes entre síndromes linfoproliferativos post-trasplante EBV positivos y negativos. Adaptación de *Morscio et al*, 2016.⁽²⁴⁾

1.1.3 Subtipos histológicos

La actual clasificación de la WHO reconoce 4 categorías principales de PTLD en base a criterios morfológicos y moleculares:⁽²⁷⁾ A) PTLD no destructivos; B) PTLD polimórficos; C) PTLD monomórficos; y D) linfoma de Hodgkin clásico.

A. PTLD no destructivos: En la clasificación de la WHO del año 2008 se reconocían 2 subtipos de lesiones no destructivas: las hiperplasias plasmáticas y las lesiones tipo mononucleosis infecciosa. Actualmente se reconoce una tercera categoría, la hiperplasia folicular florida. Todas ellas suelen presentarse en niños o en edades más tempranas que otros PTLD, y están relacionados con más frecuencia a primoinfecciones por EBV. Aunque son lesiones reactivas que pueden regresar con el control de la inmunosupresión, estas lesiones pueden tener alteraciones cromosómicas y evolucionar a formas monomórficas o polimórficas.^(28,29) Clínicamente, se presentan como masas y prácticamente en todos los casos existe relación con EBV. Histológicamente siempre existe preservación de la arquitectura. Generalmente son lesiones policlonales aunque también existen casos descritos de mononucleosis infecciosa con poblaciones oligoclonales o clonales.^(5,30) La hiperplasia plasmática se caracteriza por numerosas células plasmáticas en un fondo de linfocitos pequeños y muy ocasionales inmunoblastos (Figura 2A). Los cuadros tipo mononucleosis infecciosa presentan una marcada expansión paracortical con numerosos inmunoblastos en un fondo de abundantes linfocitos T y células plasmáticas. En la hiperplasia folicular florida, el número de inmunoblastos interfoliculares es menor que en los casos de mononucleosis infecciosa.

B. PTLD polimórficos: Están constituidos por una población heterogénea de células con diferentes grados de diferenciación plasmática y de atipia citológica que incluyen células inmunoblásticas y células tipo Reed-Sternberg (Figura 2B). Frecuentemente hay borramiento de la arquitectura subyacente y pueden existir áreas de necrosis. El diagnóstico es difícil en muchos casos y el diagnóstico diferencial es amplio e incluye desde lesiones no destructivas como los cuadros tipo mononucleosis infecciosa o la úlcera mucocutánea hasta linfomas como el linfoma de Hodgkin clásico, linfomas de

células grandes rico en células T e histiocitos o linfomas T, especialmente el linfoma T angioinmunoblástico. La mayoría de estas lesiones son también EBV positivas y aunque con menos frecuencia que en los PTLD monomórficos se puede demostrar la presencia de un pico clonal para el reordenamiento del gen de la cadena pesada de las inmunoglobulinas. La disminución de la inmunosupresión a veces consigue revertir y controlar la proliferación linfoide.⁽³¹⁾ Sin embargo, algunos casos progresan a formas más agresivas y requieren tratamientos quimioterápicos.^(5,32,33) El cariotipado de estas lesiones ha mostrado alteraciones citogenéticas hasta en un 15-30% de los casos.^(16,28)

C. PTLD monomórficos: Los PTLD de tipo monomórfico se clasifican de acuerdo a los criterios del linfoma al cual se asemejan.⁽²⁷⁾ Por definición, los linfomas de bajo grado no se consideran dentro del espectro de los PTLD y solamente los linfomas agresivos de células B (Figura 2C) y, más raramente de células T o T/NK entrarían en este espectro. La mayoría de las lesiones monomórficas son clonales y además suelen tener también alteraciones en oncogenes y/o genes supresores de tumores como *TP53*, *MYC* y *RAS*.⁽⁵⁾ Las alteraciones citogenéticas están presentes en más del 70% de los casos. Las más frecuentes son la trisomía 9, la trisomía 11 y los reordenamientos que afectan a 8q24.1.⁽¹⁶⁾ El perfil de expresión genómica también ha identificado un elevado número de alteraciones cromosómicas, algunas de las cuales son claramente diferentes de las que ocurren en casos de linfoma difuso de células grandes B (DLBCL) en pacientes inmunocompetentes, como ganancias del cromosoma 5p y 11q; pérdidas de 12p; y pérdidas de heterocigosidad en el cromosoma 10.^(16,20) Los SNP-arrays (del inglés, *single nucleotid polymorphism arrays*) han demostrado una complejidad genética similar a la observada en pacientes inmunocompetentes con DLBCL, pero también algunos hallazgos distintivos como son deleciones de 2p16.1 (*FRA2E*) y la falta de del(13q14.3) (*MIR15/MIR16*).^(16,20)

D. PTLD tipo linfoma de Hodgkin clásico: El linfoma de Hodgkin es el subtipo histológico menos frecuente y generalmente se da en el contexto de pacientes sometidos a un trasplante renal. Prácticamente siempre son EBV positivos y cumplen todos los criterios de linfoma de Hodgkin en pacientes inmunocompetentes (Figura 2D).

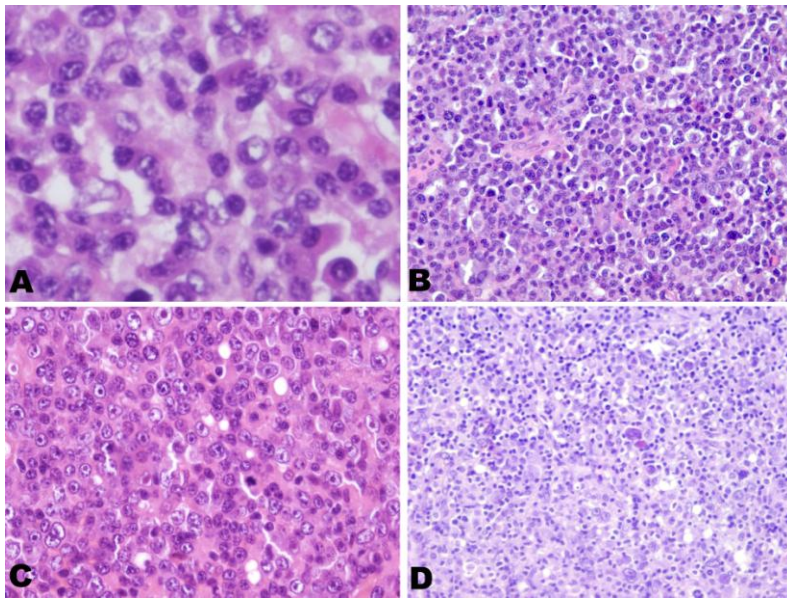


Figura 2: Subtipos histológicos de los síndromes linfoproliferativos post-trasplante (PTLD). **A)** Hiperplasia plasmacítica (PTLD no destructivo). **B)** PTLD polimórfico. **C)** PTLD monomórfico tipo linfoma difuso de células grandes B. **D)** PTLD tipo linfoma de Hodgkin clásico

1.1.4 Tratamiento

El principal objetivo cuando se aborda el tratamiento de los pacientes con PTLD es curar la enfermedad y preservar las funciones del injerto. Debido a la marcada heterogeneidad clínica de los PTLD no existe un modelo estandarizado para el manejo óptimo de este grupo de enfermedades y las estrategias de tratamiento se adaptan a las condiciones clínicas concretas en función del riesgo de rechazo, el tipo de injerto, las comorbilidades del paciente y la presentación clínica. Dentro de las opciones de tratamiento se incluyen la reducción de la inmunosupresión, la quimioterapia, la inmunoterapia (rituximab), la cirugía y la radiación o bien una combinación de estas. Normalmente la primera aproximación terapéutica es la disminución de la inmunosupresión y si la respuesta no es completa, los pacientes son tratados con rituximab seguido en caso que sea necesario de quimioterapia.

Disminución de la inmunosupresión: Es la primera medida terapéutica en el tratamiento de todos los PTLD. Las tasas de respuesta son muy variables ya que en pacientes con PTLD-EBV positivos varían entre el 23 y el 50% en función del grado de reducción de la inmunosupresión o del momento de inicio de la enfermedad.⁽³⁴⁾

Tratamientos basados en rituximab: La inmunoterapia con rituximab es el tratamiento de primera línea para los pacientes que no responden a la disminución de la inmunosupresión. Se estima que su administración con fines terapéuticos tiene unas tasas de respuesta del 40-68%⁽³⁵⁻³⁷⁾ y cuando se usa profilácticamente antes del desarrollo de la enfermedad se ha demostrado que hasta en el 90% de los casos puede prevenir la aparición de un PTLD-EBV positivo.⁽³⁸⁾ Además parece ser que el uso de rituximab en los pacientes que no responden a la reducción de la inmunosupresión aumenta la supervivencia, con respuestas estables tras un año de tratamiento.⁽³⁹⁾

Células T citotóxicas: El uso de células T citotóxicas específicas contra el virus (CTLs) es una terapia dirigida para la prevención y tratamiento de los PTLD-EBV positivos especialmente en los desarrollados tras trasplante de progenitores hematopoyéticos. Se usan células EBV inmortalizadas de líneas celulares como células presentadoras de antígeno que estimularán las células T EBV específicas. Éstas, al cabo de 3-4 semanas se pueden transferir al enfermo.⁽⁴⁰⁾ Los resultados más prometedores mediante esta aproximación terapéutica se han conseguido en el campo de la prevención,⁽⁴¹⁾ ya que la limitación de la terapia radica en el tiempo de obtención de las mismas. Debido a que generalmente los PTLD requieren tratamiento urgente se están intentado desarrollar medidas para generar o disponer de manera rápida CTLs mediante la estimulación durante 24 horas de células mononucleares de donante con péptidos EBV específicos⁽⁴²⁾ o mediante la creación de bancos de CTLs criopreservadas.⁽⁴³⁾ Aunque estos ensayos conseguirían tener CTLs disponibles en menos de 36 horas, su uso todavía no está ampliamente incorporado a la práctica clínica habitual.

Antivirales: El uso de antivirales se ha propuesto como herramienta terapéutica y estrategia preventiva. Tanto en pacientes pediátricos como en adultos el uso de ganciclovir se ha asociado a una disminución del riesgo de PTLD.^(44,45) Sin embargo, no existen estudios prospectivos randomizados para validar estos hallazgos. Hay que tener en cuenta que los antivirales se activan y pasan a ser efectivos con la timidina kinasa viral que solamente se expresa cuando el virus replica (Figura 3), de manera que en aquellos tumores en los que el virus se encuentra exclusivamente en fase de

latencia los antivirales no serían efectivos. Por este motivo, se están intentado desarrollar estrategias que reactiven los genes de fase lítica del virus en las células latentemente infectadas.⁽⁴⁴⁻⁴⁶⁾ Existen diversos fármacos inductores de la replicación viral, como el 5-fluorouracil, el metotrexate, la doxorubicina, o la arginina butirato y la combinación de estos fármacos con antivirales parece mejorar la respuesta clínica en pacientes con enfermedades asociadas a EBV refractarias a otros tratamientos.⁽⁴⁷⁾ Dado su posible uso clínico, la detección de replicación viral permitiría seleccionar mejor a aquellos pacientes que serían candidatos a estos tratamientos. Sin embargo, su estudio no está incluido en la rutina diagnóstica de los PTLD.

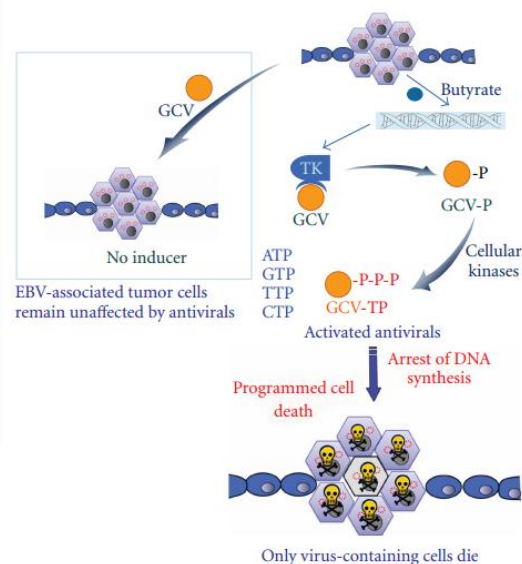


Figura 3: Ganciclovir (GCV) requiere de la timidina kinasa (TK) viral para su fosforilación y adquisición de la capacidad antiviral (GCV-P). Existen fármacos inductores de la replicación como la arginina butirato. Adaptación de *Ghosh et al*, 2013.⁽⁴⁸⁾

Tratamientos dirigidos a vías de señalización específicas: debido a la interacción de proteínas virales con moléculas de señalización implicadas en la linfomagénesis (Ver páginas 36-40) se están estudiando posibles dianas terapéuticas dirigidas a la inhibición de estas vías en diferentes síndromes linfoproliferativos asociados a EBV (Figura 4).⁽⁴⁹⁾ Otra medida terapéutica emergente es el bloqueo del eje PD-1-PD-L1.⁽⁵⁰⁾ Las alteraciones genéticas que afectan 9p24.1 e involucran PD-L1, PD-L2 y JAK2 han demostrado ser muy frecuentes en diferentes estados de inmunodeficiencia, tanto en síndromes linfoproliferativos EBV positivos como negativos.⁽¹⁸⁾ Estos hallazgos, aparte de sugerir un mecanismo común para los ID-LPD, abren también las puertas a nuevas dianas terapéuticas prometedoras. Éstos fármacos

inducen respuestas clínicas duraderas frente a diversos tumores sólidos⁽⁵¹⁾ y su uso está aprobado también en el tratamiento de los linfomas de Hodgkin recidivados o refractarios.⁽⁵²⁾ Además, en modelos murinos de linfomas asociados con infección por EBV se ha demostrado tanto la disminución del crecimiento tumoral como del número de células infectadas tanto en fase lítica como latente.⁽⁵³⁾

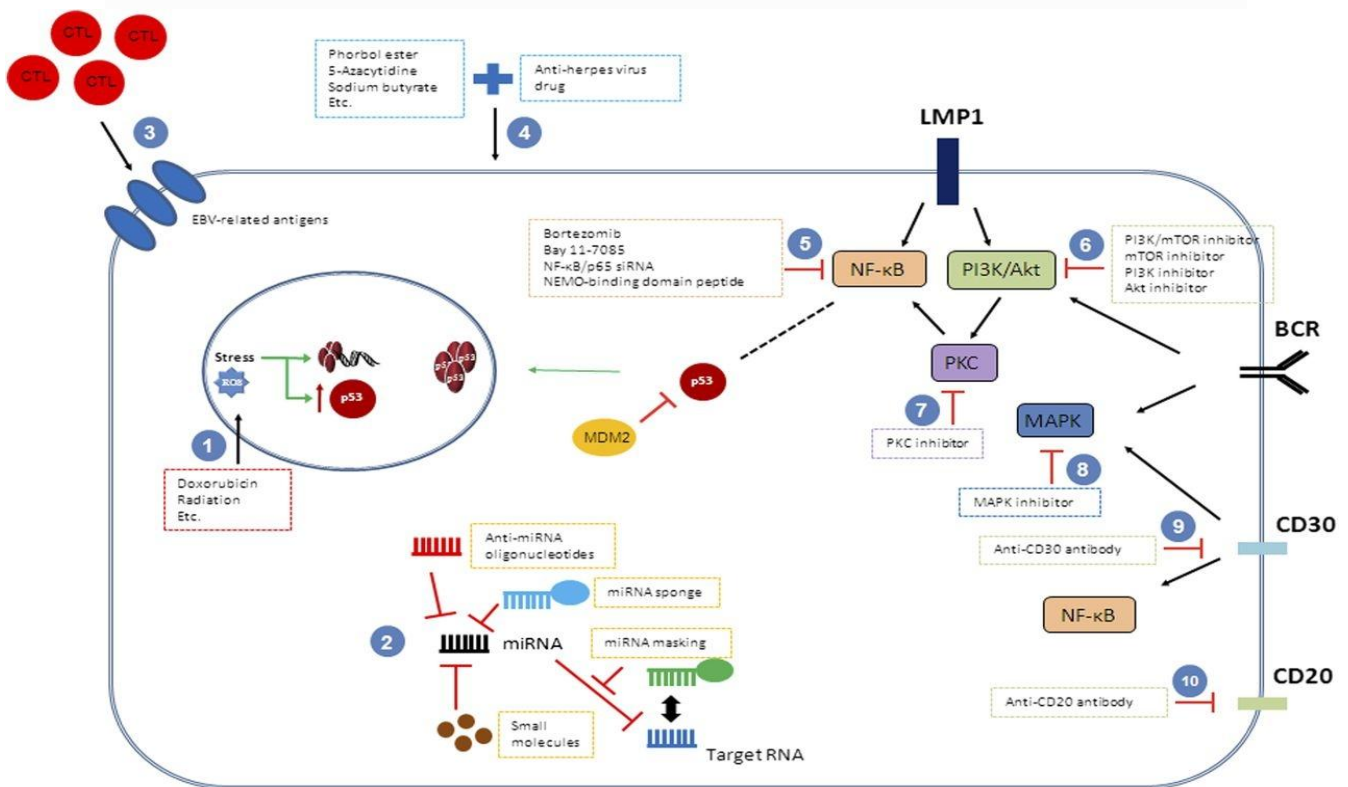


Figura 4: Vías de señalización relacionadas con la patogénesis de EBV y sus posibles dianas terapéuticas. Adaptación de *Ok et al*, 2013.⁽⁴⁹⁾

1.2 Síndromes linfoproliferativos asociados a la infección por HIV

1.2.1 Epidemiología y patogénesis

Los linfomas no-Hodgkin son considerados como una condición definitoria del Síndrome de la inmunodeficiencia humana adquirida y actualmente representan el tipo más frecuente de cáncer y de muerte por cáncer en pacientes con HIV en los países desarrollados.⁽⁵⁴⁻⁵⁷⁾ En cierta manera la patogénesis de los linfomas en pacientes infectados con HIV es similar a la de otros estados de inmunodeficiencia como el post-trasplante o las inmunodeficiencias congénitas en la que participan cofactores como los virus oncogénicos, la estimulación antigénica crónica y la sobreproducción de citocinas. Sin embargo, una pregunta no del todo resuelta es por qué una vez restablecida la inmunidad de los pacientes con terapia antirretroviral combinada (cART) estos pacientes desarrollan más linfomas que la población general. Hallazgos recientes apoyan que el propio virus puede contribuir directamente en la linfomagénesis independientemente del grado de inmunosupresión. Por un lado se ha demostrado que existe un reservorio natural del virus en ganglios linfáticos donde éste puede continuar replicando y circular entre el ganglio y la sangre incluso en el contexto de cART efectiva.⁽⁵⁸⁾ Estos hallazgos abren un nuevo escenario donde las células T folicular helper (TFH) juegan un papel crítico.⁽⁵⁹⁾ Las células TFH de pacientes infectados con HIV son funcional y fenotípicamente distintas a la de los controles HIV negativos (Figura 5).⁽⁶⁰⁾ Este hecho explica en parte el mayor desarrollo de neoplasias asociadas a VEB y HHV8, ya que las células TFH en pacientes HIV producen grandes cantidades de moléculas importantes en la linfomagénesis mediada por virus, como IL-21 y además promueven la proliferación de células B de centro germinal y células plasmáticas.⁽⁶⁰⁻⁶²⁾ Por otro lado, recientemente se ha demostrado que existen variaciones en algunas partículas virales de HIV en pacientes que desarrollan linfomas en comparación de aquellos pacientes que no los desarrollan y que estas proteínas alteradas tienen efectos directos en la proliferación de células B,⁽⁶³⁾ lo que sugiere que además de la estimulación antigénica crónica mediada por la infección por HIV el

propio virus es responsable en parte de la linfomagénesis a través de los efectos mediados por células TFH y a través de determinadas partículas virales.

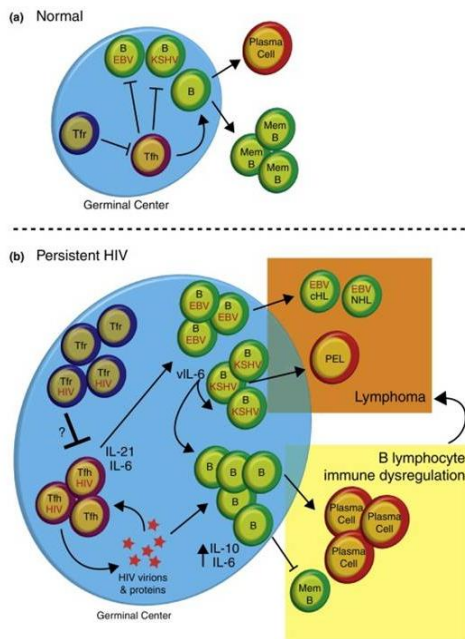


Figura 5: Modelo de alteración intrafolicular involucrado en la linfomagénesis en infección crónica por VIH. **A)** *Ganglios normales:* las células T reguladoras controlan la proliferación de las TFH que a su vez inhiben la replicación de los virus herpes oncogénicos y regulan la reacción de centro germinal con la producción de células de memoria y células plasmáticas. **B)** *En infección por HIV* se produce una expansión de las T reguladoras y TFH pero con funcionalidad alterada de manera que se permite la proliferación de los virus con potencial linfomagénico y disminuye la producción de las células B de memoria con incremento de la diferenciación plasmocelular, debido al fallo de interacción de las células TFH y células B. Adaptación de *Totonchy et al, 2016.*⁽⁶²⁾

1.2.2 Subtipos histológicos

El espectro de lesiones linfoproliferativas que se pueden desarrollar en el contexto de infección por HIV es amplio y diverso y abarca desde lesiones benignas y específicas hasta linfomas agresivos similares a los que se desarrollan en pacientes inmunocompetentes. Aunque la mayoría corresponderán a linfomas B agresivos, también pueden ocurrir otros linfomas como el linfoma de la zona marginal, el linfoma T periférico y linfomas de células NK.⁽⁶⁴⁻⁶⁸⁾

La linfadenopatía persistente generalizada es una proliferación linfoide benigna, típica de pacientes con infección por HIV. Se define como la presencia de linfadenopatías de 3 o más meses de evolución afectando 2 o más territorios no-continuos y en ausencia de enfermedad intercurrente o toma de fármacos que se

asocian con el desarrollo de linfadenopatías. Clínicamente puede simular linfomas, manifestándose con síntomas constitucionales como fiebre, sudoración nocturna, pérdida de peso, malestar general y asociarse a la presencia de hepatoesplenomegalia, anemia, leucopenia e hipergammaglobulinemia.⁽⁶⁹⁾ El cuadro histológico es también variable en función del momento de la biopsia. En estadios iniciales existe hiperplasia folicular marcada con presencia frecuente de foliculolisis o fragmentación folicular con abundantes células T CD8⁺, y en fases más tardías, coincidiendo con la disminución de células T CD4⁺, existe marcada depleción linfoide con folículos prácticamente inexistentes, aumento significativo de la vascularización y cambios hialino-vasculares.^(70,71) Su diagnóstico es difícil debido al solapamiento morfológico con otras lesiones como la enfermedad de Castleman o otras condiciones reactivas que pueden presentarse de forma similar. El tratamiento con cART permite controlar estas lesiones al restablecer la inmunidad del paciente.

El linfoma plasmablástico es una neoplasia agresiva inicialmente descrita en la cavidad oral de pacientes HIV positivos⁽⁷²⁾ aunque también puede verse en otros tipos de inmunodeficiencia e incluso en pacientes aparentemente inmunocompetentes principalmente de edad avanzada.⁽⁷³⁾ En el contexto de infección por HIV acostumbra a desarrollarse en pacientes más jóvenes y suele estar asociado con mayor frecuencia a la infección por EBV.⁽⁷⁴⁾ Desde el punto de vista morfológico consiste en una proliferación de plasmablastos o inmunoblastos que fenotípicamente carecen de expresión de marcadores de células B maduras (CD20, PAX5, CD45) y tienen características de célula plasmática con expresión de IRF4, CD138, CD38, EMA y/o inmunoglobulinas citoplasmáticas. Típicamente se asocian a infección por EBV con latencias tipo 1 o más raramente tipo 2.⁽⁷⁵⁾ Un 50% de los casos presentan translocaciones de MYC⁽⁷⁶⁾ asociadas a un peor pronóstico.⁽⁷⁷⁾ Aunque generalmente la evolución de estos linfomas es mala,^(72,78,79) existen estudios que sugieren un mejor pronóstico en el contexto de infección por HIV.⁽⁸⁰⁾ Sin embargo, los resultados son todavía contradictorios.⁽⁸¹⁾

Linfoma difuso de células grandes B (DLBCL): Es el linfoma más frecuente en pacientes HIV. Morfológicamente son similares a los desarrollados en pacientes

inmunocompetentes con sábanas de centroblastos mezclados con un número variable de inmunoblastos. La asociación con EBV es más frecuente en los casos con mayor número de inmunoblastos. La mayoría de casos son sistémicos y con frecuencia afectan a territorios extranodales como la cavidad oral y el tracto gastrointestinal. Un número significativo de casos también se presentan primariamente en el sistema nervioso central sobre todo en pacientes con niveles bajos de CD4.

Linfoma de Burkitt: Desde el punto de vista morfológico, el linfoma de Burkitt desarrollado en el contexto de infección con HIV es también similar al de los pacientes inmunocompetentes aunque se acepta un mayor pleomorfismo celular y a veces exhiben características plasmocitoides. A parte de estas particularidades morfológicas y su mayor asociación a EBV, el resto de hallazgos fenotípicos y genéticos son superponibles a los linfomas de Burkitt de pacientes HIV negativos. No existe todavía una aproximación terapéutica óptima para su tratamiento pero gracias al uso de cART se puede usar terapia intensiva para tratar la enfermedad.

Linfoma de Hodgkin clásico: Aunque no se considera una condición definitoria de síndrome de la inmunodeficiencia humana adquirida, los pacientes con HIV tienen un riesgo aumentado de desarrollar un linfoma de Hodgkin (HL) y su incidencia parece aumentar durante los primeros meses tras iniciar el tratamiento con cART.⁽⁸²⁾ En el contexto de infección por HIV se puede presentar con afectación exclusiva de médula ósea o en localizaciones extranodales y frecuentemente se presenta en estadios avanzados (III o IV) con síntomas B acompañantes. Desde el punto de vista morfológico e inmunofenotípico son similares pero hay una mayor incidencia de los subtipos celularidad mixta y depleción linfoide. Además, la práctica totalidad de los HL en HIV son EBV positivos y presentan una inversión en el cociente CD4/CD8.

Otros síndromes linfoproliferativos que se desarrollan en el contexto de infección por HIV son la enfermedad de Castleman multicéntrica (MCD), el linfoma de células grandes HHV8 positivo y el linfoma primario de cavidades (PEL). Estas lesiones se discuten más adelante, en el apartado 2.2.3, debido a su asociación con la infección por HHV8.

1.3 Síndromes linfoproliferativos asociados a inmunodeficiencias iatrogénicas

Según la clasificación de la WHO del 2008, los síndromes linfoproliferativos asociados a inmunodeficiencias iatrogénicas son *“proliferaciones linfoides o linfomas que se desarrollan en pacientes que reciben tratamientos con agentes inmunosupresores debido a enfermedades autoinmunes u otras condiciones distintas al trasplante”*.⁽²⁾ Determinar si el responsable del desarrollo del síndrome linfoproliferativo es el agente inmunosupresor es difícil, ya que el trastorno inmune subyacente del paciente puede tener también un papel importante.

Los síndromes linfoproliferativos asociados a inmunodeficiencias iatrogénicas más bien caracterizados son los asociados al uso de metotrexate durante más de 3 años en pacientes con artritis reumatoide de larga evolución (más de 15 años).⁽⁸³⁾ Sin embargo, también existen casos asociados a tratamientos anti-TNF α en pacientes con enfermedad de Crohn u otras enfermedades autoinmunes.⁽⁸⁴⁾

Desde el punto de vista morfológico, del mismo modo que sucede en los otros grupos, los síndromes linfoproliferativos desarrollados en este contexto son muy variables y pueden también tener apariencia reactiva, polimórfica o ser claros linfomas. Además, existen ciertas particularidades en cuanto a la incidencia de los distintos subtipos de linfomas, ya que los pacientes sometidos a tratamientos con metotrexate tienen una incidencia aumentada de linfomas de Hodgkin⁽⁸⁵⁾ y por el contrario, en pacientes sometidos a tratamientos con anti-TNF α por enfermedad de Crohn se describe incremento de los linfomas T hepatoesplénicos, especialmente a aquellos pacientes que se tratan con agentes tiopurínicos.^(86,87)

A diferencia de los otros grupos la asociación con EBV no es tan evidente, ya que solamente el 15-25% están asociados a la infección viral. De todos modos, la determinación del status viral es indispensable ya que las lesiones EBV positivas podrían también regresar al controlar la inmunosupresión⁽⁸⁸⁾ del mismo modo que sucede con los PTLT.

1.4 Síndromes linfoproliferativos asociados a la edad

Aunque los síndromes linfoproliferativos asociados a la edad no están reconocidos como una categoría específica por la WHO, sabemos que la inmunosenescencia, definida como el complejo espectro de cambios regresivos que afectan al sistema inmune durante el envejecimiento, juega un papel importante en el desarrollo de síndromes linfoproliferativos. Éstos se describieron por primera vez en Japón en el año 2003⁽⁸⁹⁾ y el mecanismo patogénico subyacente radica en una respuesta T deficitaria.⁽⁹⁰⁾ En 2011 se propuso un modelo de clasificación de estas lesiones en 4 categorías diagnósticas con características clínico-patológicas específicas: hiperplasias reactivas, cuadros polimórficos nodales o extranodales y linfomas difusos de células grandes.⁽⁹¹⁾ Todas estas lesiones eran EBV positivas en distinta proporción y tenían una supervivencia diferente. En la clasificación de la WHO de 2008 se incluía la categoría de DLBCL asociado a la edad. Sin embargo, como también existen casos de linfomas agresivos EBV positivos en pacientes jóvenes,⁽⁹²⁾ en la actualización de 2016 se prefiere clasificar estos casos como linfomas difusos EBV positivos, sin otra especificación (NOS).⁽²⁷⁾

2. VIRUS HERPES ONCOGÉNICOS

El papel directo o indirecto de ciertos virus en el desarrollo de neoplasias hematológicas se había intuido desde hace años en base a modelos animales.^(93,94) En las últimas décadas se ha demostrado de una forma concluyente la implicación causal de una variedad de virus en el desarrollo de determinados tipos de leucemias y linfomas en el ser humano. La oncogénesis viral humana es compleja y todavía en gran medida desconocida. Los virus con potencial oncogénico en el hombre pueden, en líneas generales, clasificarse en dos grandes categorías: los retrovirus (virus RNA) y los virus de la familia herpes (DNA), y dentro de cada grupo se identifican diferentes

subtipos (Tabla 1). En esta tesis doctoral nos centramos principalmente en el papel de los virus de la familia herpes y su implicación en la linfomagénesis.

Tabla1: Principales virus con potencial oncogénico

Retrovirus

Virus de la leucemia linfoma T (HTLV-1)

Virus de la inmunodeficiencia humana (HIV)

Familia herpes virus

Virus de Epstein-Barr (EBV, HHV4)

Virus del sarcoma de Kaposi (KSHV, HHV8)

Otros virus

Virus de la hepatitis C (VHC)

Virus herpes tipo 6 (HHV6)

2.1 Virus de Epstein-Barr

2.1.1 Ciclo viral

El virus de Epstein-Barr (EBV) también llamado virus herpes humano 4 (HHV4), es uno de los 8 virus de la familia de los gamma herpes virus y uno de los virus más comunes en humanos. Se estima que el 95% de las personas se infecta durante los primeros años de vida. Aunque en la mayoría de casos la primoinfección es asintomática, en una proporción de casos se desarrolla un cuadro agudo autolimitado llamado mononucleosis infecciosa. Tras la primoinfección, se obtiene inmunidad adaptativa a través del desarrollo de anticuerpos específicos contra el virus que consiguen controlar la infección primaria pero no provocan su eliminación completa. De manera que el virus se queda de forma latente como un episoma dentro de las células B de memoria durante toda la vida, con un equilibrio perfecto entre infección viral silente y respuesta inmune. En los portadores de infección por EBV existen de

manera continua niveles bajos de replicación viral que permiten la transmisión viral de un individuo a otro a través de secreciones orales (Figura 6).⁽⁹⁵⁾

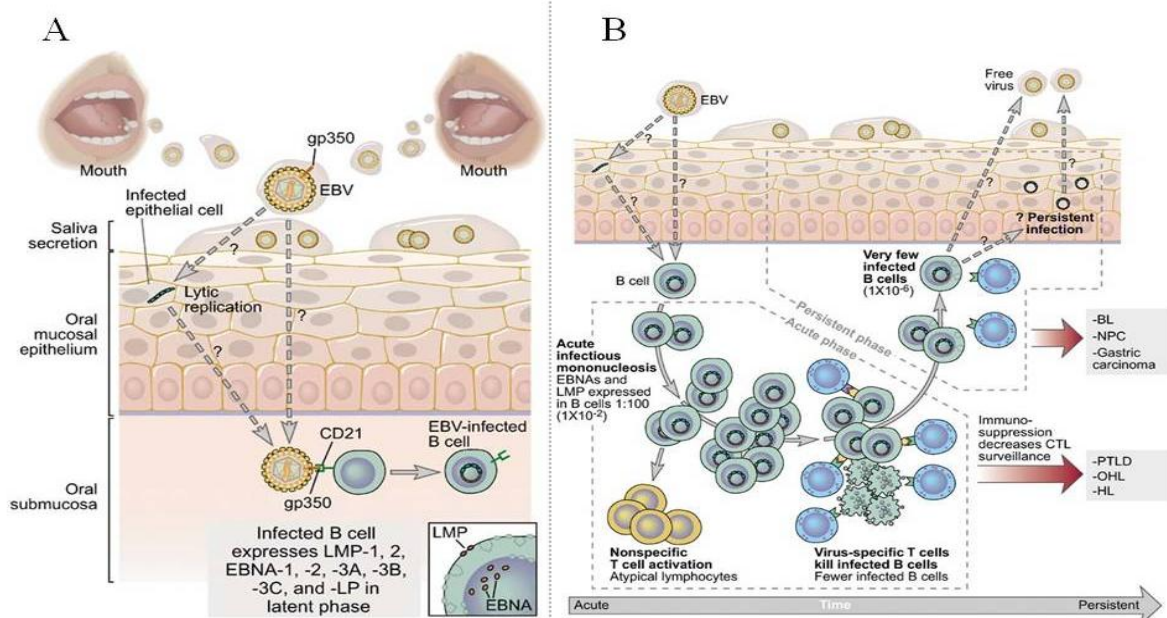


Figura 6. Ciclo viral de la infección por virus de Epstein-Barr

A) Tras el contacto con individuos infectados las partículas virales de la saliva entran en la cavidad oral del nuevo huésped. Los virus penetran en el tejido linfático y a través de la proteína de la cápsida gp350 el virus contacta con CD21, expresado en las células B, y entra en la célula B con expresión del programa de latencia tipo III.

B) Cuando la célula B está infectada, se produce proliferación de células B que provoca activación de células T no específicas. Las células T ocasionan la aparición de linfocitos atípicos en sangre periférica y si ésta es suficientemente vigorosa provoca la aparición de una mononucleosis infecciosa. Con el tiempo, se va desarrollando inmunidad T específica que conlleva la reducción del número de células B infectadas. En condiciones normales, se controla la infección y se entra en una fase de latencia donde el virus está solamente presente en escasas células B. La replicación viral, ya sea en linfocitos o células epiteliales, provoca la liberación de nuevas partículas virales a través de las secreciones orales. En estados de inmunodeficiencia la respuesta citotóxica T está disminuida con el subsecuente riesgo de desarrollar proliferaciones linfoides asociadas al virus.

Adaptación de Kutok et al 2006.⁽⁹⁵⁾

Fase de latencia

El genoma (ADN) del EBV codifica para un gran número de moléculas que poseen una función específica. Entre las más importantes destacan dos ARN nucleares (EBER1/2), tres proteínas latentes de membrana (LMP), y seis que codifican factores de transcripción (EBNAs). Cada uno de éstas tiene un papel determinado y ejerce

funciones análogas a moléculas humanas con un papel destacado en la regulación del ciclo celular y la oncogénesis.

- Los **EBERs** son los RNAs no codificantes. Se expresan de manera muy abundante en todas las células infectadas por el virus. Es por este motivo que su detección con técnicas de hibridación *in situ* es el método de elección para la determinación de la infección viral en tejidos.⁽⁹⁶⁾ Inducen la señalización de Toll-Like receptor y la producción de interferón y citocinas proinflamatorias,⁽⁹⁷⁾ así como resistencia a la apoptosis.⁽⁹⁸⁾

- **EBNA1** se encarga del mantenimiento del episoma viral y protege a la célula infectada de la muerte celular.⁽⁹⁹⁾ También aumenta la inestabilidad genómica a través de la regulación de Rag-1 y Rag-2.⁽¹⁰⁰⁾

- **EBNA-2** es un análogo de NOTCH y actúa a través de la inhibición de la proteína represora RBP-Jkappa y promueve la activación de genes diana de células B.⁽¹⁰¹⁾

- **LMP1** es la principal proteína oncogénica del virus. LMP1 es suficiente para transformar fibroblastos de ratas y es indispensable para la transformación de células B *in vitro*. Imita funcionalmente al receptor CD40,⁽¹⁰²⁾ el cual se expresa de manera constitutiva en la membrana de la célula B y participa en la activación y proliferación de las células B. LMP-1 proporciona señales de proliferación a través de la activación de diversas vías como NF-κB, PI3K/Akt, MEK-ERK y JNK-AP-1 MAPK. También aporta señales de progresión del ciclo celular con la activación de la kinasa 2 dependiente de ciclina (Cdk2) y la fosforilación de la proteína del retinoblastoma (Rb) e inhibe p16 y p27. Asimismo, también proporciona señales anti apoptóticas mediante la activación de *BCL2*⁽¹⁰³⁾ y regula una gran variedad de genes relacionados con el ciclo celular.⁽¹⁰⁴⁻¹⁰⁶⁾ Recientemente se ha descrito también que LMP1 activa la expresión del promotor de PD-L1, el cual se halla expresado hasta en un 70% de los PTLD.⁽⁵⁰⁾

- Las proteínas **LMP2, LMP2A y LMP2B** no son esenciales para la transformación inducida por EBV. Sin embargo, la expresión de LMP2A en células B de ratones transgénicos impide el desarrollo normal de células B y puede impulsar la proliferación y la supervivencia de las células B en ausencia de señalización del receptor de células B

(BCR) a través de la activación de la vía de PI3K-AKT. Además, induce la expresión de una gama de genes que están implicados en la inducción del ciclo celular, la inhibición de la apoptosis y la supresión de la inmunidad mediada por células.⁽¹⁰⁷⁻¹⁰⁹⁾

La expresión de las diferentes proteínas del virus es diferente en las células normales y en las neoplásicas. En este sentido, se han descrito tres tipos de expresión o latencia cada uno relacionado con subtipos específicos de linfomas (Figura 7).⁽¹¹⁰⁾

Latencia tipo I: únicamente hay expresión de EBNA1 y EBERs. Es el patrón de latencia que se expresa en portadores sanos y en los linfomas de Burkitt. Las células T citotóxicas no reconocen a EBNA1 debido a una repetición larga glicina-alanina, de manera que las células infectadas pueden evadir con facilidad el sistema inmune y permanecer en estado latente en células de memoria durante toda la vida.

Latencia tipo II: Este patrón se divide en latencia tipo IIa y tipo IIb. Ambas comparten características pero difieren en la expresión de las proteínas necesarias en la transformación celular.

Latencia tipo IIa: es la latencia propia del linfoma de Hodgkin, de los carcinomas nasofaríngeos y de los linfomas T/NK y se caracteriza por mostrar expresión de EBNA1, LMP1 y LMP2. Otros EBNA son característicamente negativos.

Latencia tipo IIb: este patrón se identificó en células infectadas *in vitro* de leucemia linfática crónica y se caracteriza por la expresión de todas las proteínas EBNA y por la ausencia de LMP1.

Latencia tipo III, el programa de crecimiento: en esta fase, se expresan todas las proteínas de latencia del virus de manera que es el programa más inmunogénico de todos. Las células que se encuentran en latencia tipo III solamente pueden existir o bien durante la fase aguda de la primoinfección antes que se desarrolle una respuesta T capaz de controlar la proliferación de células infectadas o bien en estados de severa inmunosupresión en que existe una falta de respuesta T eficaz, capaz de controlar la infección viral.

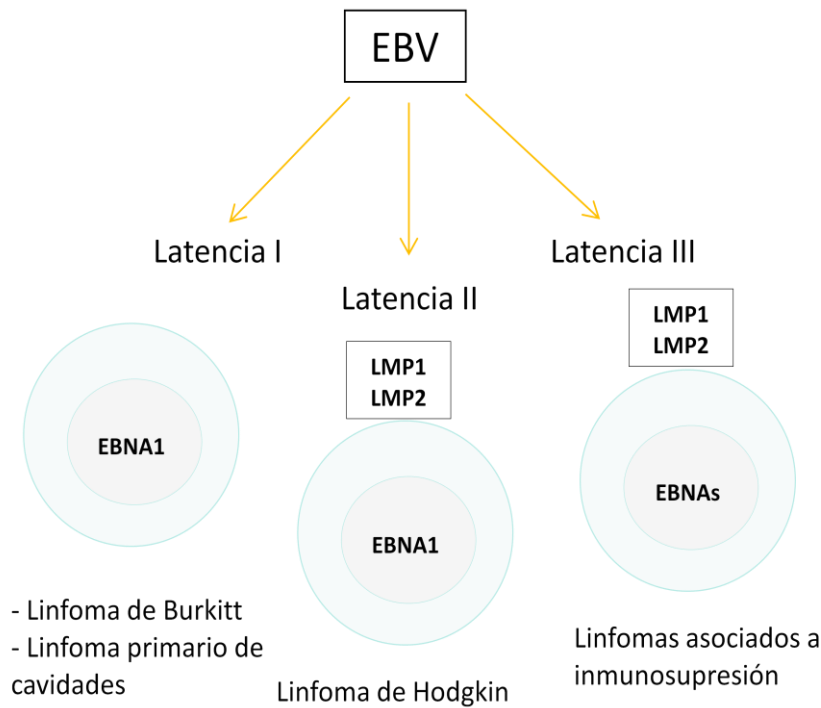


Figura 7: Patrones de latencia del EBV. Modificado de *Kutok et al*, 2006. ⁽⁹⁵⁾

Fase lítica o de replicación

Además de la fase de latencia, una característica común de todos los herpes virus es que existe una fase lítica o de replicación⁽⁹⁵⁾ durante la cual se producen partículas virales. Los genes de fase lítica se producen en tres estadios consecutivos: inmediatos-tempranos, tempranos y tardíos. Los genes inmediatos-tempranos (BZLF1 o ZEBRA y BRLF1 o EADE-31) promueven la expresión de los genes de fase lítica tardíos y participan en la replicación, metabolismo viral y el procesamiento antigénico. Algunos genes de fase lítica tardíos, como VCA (del inglés, *viral capsid antigen*), tienen papeles estructurales y son indispensables para la formación de la cápside viral y otros como BCRF1 ayudan al virus en la evasión del sistema inmune.⁽¹¹¹⁾ Otros genes de fase lítica tienen un papel en el desarrollo tumoral ya que promueven la supervivencia de la neoplasia al actuar de forma análoga a *BCL2*.^(112,113) Clásicamente se asociaba el poder oncogénico de EBV solamente a la fase de latencia. No obstante, en modelos animales, se ha demostrado que la fase lítica juega también un papel crucial ya que los ratones infectados con cepas de EBV con capacidad replicativa desarrollan más linfomas.⁽¹¹⁴⁾ La importancia de la detección de replicación viral en

linfomas humanos relacionados con EBV no está bien estudiada. Sin embargo, como se reporta en las páginas 24-25, su análisis sería de vital importancia en muestras humanas de síndromes linfoproliferativos EBV positivos debido a las implicaciones terapéuticas que este hallazgo pueda conllevar.

Cepas variantes

Actualmente sabemos que EBV puede dividirse en dos tipos, EBV-1 y EBV-2 (o tipo A y B, respectivamente), que se distinguieron en base a diferencias génicas en los antígenos nucleares (EBNAs).^(115,116) Se ha sugerido que las variaciones en la secuencia del virus pueden conducir a una interacción distinta con las células huésped, la evasión inmune y la transformación. EBV-1 se describe como más capaz de transformar las células B y es predominante en los países occidentales y asiáticos, EBV-2 parece transformar las células menos eficientemente y se encuentra más frecuentemente en África.⁽¹¹⁷⁾ Una de las variaciones más estudiadas en la secuencia del genoma de EBV es una delección de 30 pares de bases en el extremo carboxi terminal de LMP1,^(118,119) la cual parece estar asociada al desarrollo de carcinoma nasofaríngeo y se ha asociado a un fenotipo más agresivo de algunos síndromes linfoproliferativos EBV positivos.⁽¹²⁰⁾ Su prevalencia varía en función del área geográfica, por lo que algunos autores han señalado que la delección de LMP1 es sólo un polimorfismo geográfico y no una variación asociada a distintos fenotipos de enfermedad.⁽¹²¹⁾

2.1.2 Detección viral precoz en sangre periférica

Como se ha mencionado en apartados anteriores, una de las medidas terapéuticas disponibles para el manejo de los síndromes linfoproliferativos EBV positivos es la reducción de la inmunosupresión, medida poco agresiva y especialmente efectiva en estadios precoces. Por este motivo se han intentado desarrollar estrategias de cribado en pacientes con ID para la detección precoz y para seleccionar pacientes con mayor riesgo de desarrollar síndromes linfoproliferativos. La mayoría de estudios en este campo se centran en la monitorización de EBV en el

contexto de pacientes trasplantados. Sin embargo, la determinación serológica del estatus viral no puede ser usada como herramienta para detectar la infección después del trasplante, ya que una vez empezado el tratamiento inmunosupresor, estos test pierden su valor predictivo positivo por la respuesta humoral deficitaria del huésped.⁽¹²²⁾ Además, la adquisición pasiva de anticuerpos en las transfusiones que se realizan en estos pacientes puede dificultar la interpretación de anticuerpos anti IgG del virus. Por el contrario, la cuantificación de la carga viral sí que puede utilizarse como herramienta para la monitorización del riesgo de desarrollo de los PTLD-EBV positivos.⁽¹²³⁾ Sin embargo, el punto de corte exacto para la toma de decisiones terapéuticas no está todavía definido ni estandarizado.^(124,125) Además, es todavía motivo de debate si la carga viral tiene que ser analizada en plasma, en sangre total o en linfocitos, aunque parece que el estudio de sangre total o linfocitos aporta resultados más sensibles aunque menos específicos.⁽¹²⁶⁾ Otra aproximación, es el estudio conjunto de carga viral junto a la medición de la respuesta T específica anti EBV. Una respuesta T disminuida y una carga viral elevada parecen tener un valor predictivo positivo para el desarrollo de PTLD.⁽¹²⁷⁾ También se ha constatado que el estudio de expresión de genes de fase lítica en relación con genes de latencia en sangre periférica es una herramienta útil en el seguimiento de estos pacientes.⁽¹²⁸⁾ Aunque su uso no está estandarizado en la rutina diagnóstica de los pacientes trasplantados.

2.1.3 Síndromes linfoproliferativos asociados al EBV

En la tabla 2 se enumeran las diversas entidades relacionadas con EBV. En color azul se señalan aquellas proliferaciones linfoides en que la detección del virus no es indispensable para el diagnóstico de la enfermedad.

Tabla 2: Síndromes linfoproliferativos asociados a infección por EBV**Proliferaciones epiteliales**

Leucoplaquia oral vellosa
Carcinoma indiferenciado

Proliferaciones linfoides**Línea B**

Linfoma de Burkitt
Linfoma de Hodgkin clásico
Síndromes linfoproliferativos post-trasplante
SLP asociados a ID
Granulomatosis linfomatoide
Linfoma plasmablástico
Linfoma primario de cavidades
Proliferaciones B asociadas a linfomas T foliculares
Mononucleosis infecciosa
Linfoma de células grandes EBV positivo, NOS
Infección crónica activa
Úlcera mucocutánea
Síndrome linfoproliferativo germinotrópico

Línea T/NK

Linfoma de células T/NK extranodal, de tipo nasal
Leucemia agresiva de células NK
SLP de la infancia de células T EBV positivos

2.2 Virus herpes tipo 8 o virus del Sarcoma de Kaposi

2.2.1 Ciclo viral

El virus herpes tipo 8 (HHV8), es un gamma herpes virus que tiene una doble cadena de DNA cuyo genoma codifica 87 marcos de lectura abiertos (ORFs, del inglés *open reading frame*) y microRNAs. Del mismo modo que otros miembros de la familia de γ -herpesvirus, el ciclo vital de HHV8 se divide en dos fases distintas, la fase lítica y la

fase latente, que se caracterizan por distintos patrones de expresión génica.⁽¹²⁹⁾ Ambas fases son importantes para la persistencia a largo plazo del virus en el huésped, y los productos génicos de ambos programas desempeñan un papel crítico en la patogénesis de las distintas enfermedades asociadas a HHV8.

Fase de latencia:

Durante la latencia, se expresan un número limitado de genes virales, como ORF73, ORF72, ORF71 y ORFK12 junto con 12 microRNAs que facilitan el establecimiento de la infección viral latente y la supervivencia a la respuesta inmune del huésped.⁽¹³⁰⁻¹³²⁾ Estos genes también están implicados en la oncogénesis inducida por HHV8 mediante la promoción del crecimiento y supervivencia celular y la inducción de citocinas inflamatorias. Durante esta fase, el genoma del virus persiste como un episoma en el núcleo de las células infectadas. Los distintos genes de latencia del virus están implicados en distintas vías de señalización celular para permitir un adecuado establecimiento y mantenimiento de la latencia.⁽¹³³⁾

- El antígeno de latencia nuclear 1, **LANA-1** (ORF73) se expresa de manera muy abundante en todas las células latentemente infectadas por el virus. Es por este motivo que es el método de elección para la determinación de la infección viral en tejidos. Se encarga del mantenimiento del episoma viral durante la división celular y tiene propiedades antiapoptóticas a través de la inhibición de p53 y es un potente regulador del ciclo celular mediante la inhibición de la proteína del retinoblastoma (Rb).
- v-Ciclina (ORF72) es homóloga de la ciclina D1 humana. Inhibe p27kip1 e induce el ciclo celular a la fase S mediante la fosforilación de Rb.
- **V-FLIP** (ORF71) activa la vía de NF-κB e inhibe la reactivación de la fase lítica, de manera que promueve la latencia y persistencia viral. Es también un inhibidor de la apoptosis mediada por Fas y participa en la vía de señalización de NOTCH.

Fase lítica:

Las células con infección latente pueden reactivarse por estímulos intracelulares o extracelulares específicos o sustancias químicas que afectan a los factores reguladores de la cromatina, tales como el ácido valproico, la hipoxia y el butirato⁽¹³⁴⁾ como resultado de lo cual, el episoma viral gradualmente relaja su estructura compacta de la cromatina, y da lugar a la expresión de todos los genes virales y la producción de partículas víricas infecciosas.⁽¹³⁵⁾ El primer gen lítico que se expresa durante la replicación en los linfocitos B es un gen inmediato temprano (IE), RTA (ORF50),⁽¹³⁶⁾ que desencadena la expresión de genes tempranos necesarios para la replicación del DNA viral, así como la expresión de otros genes tardíos.⁽¹³⁷⁻¹³⁹⁾ El proceso de transición de la fase de latencia a la fase lítica no está todavía bien caracterizado, pero sabemos que la expresión secuencial de estos productos líticos víricos promueve la proliferación celular, la angiogénesis y la inflamación local.^(140,141) También puede darse la expresión de algunos genes de fase lítica en ausencia de expresión de RTA. Por ejemplo XBP1, un factor de transcripción asociado a la diferenciación plasmocelular, puede activar vIL6 que es un gen típico de replicación viral.⁽¹⁴²⁾ A continuación se enumeran algunas de las funciones de los principales genes de fase lítica del HHV8.

- K1: regula la fase lítica y activa las vías de MEK/Erk y PI3K/Akt. Su sobreexpresión se asocia a propiedades oncogénicas y promueve la angiogénesis.
- K15: regula la fase lítica y activa las vías de MEK/Erk y NF-Kb. Promueve la angiogénesis y la capacidad de invasión de las células endoteliales así como la producción de citocinas proinflamatorias.
- vIL6: Promueve la proliferación de células B y la angiogénesis. Induce la secreción de VEGF y de IL6. Su expresión está regulada por NOTCH intracelular.

El perfil de expresión viral, del mismo modo que ocurre con EBV, es diferente entre los diversos síndromes linfoproliferativos asociados a HHV8, de manera que en el sarcoma de Kaposi o en el PEL la mayoría de las células están en fase de latencia y

solamente un pequeño porcentaje expresa genes de fase lítica, mientras que la mayoría de células en los casos de MCD expresan vIL6 y vLRF1.⁽¹⁴³⁻¹⁴⁵⁾ De hecho, los niveles séricos de las distintas proteínas del HHV8 pueden discriminar entre pacientes con sarcoma de Kaposi y aquellos que además presentan una MCD.⁽¹⁴⁶⁾

2.2.2 Detección viral precoz en sangre periférica

El DNA viral de HHV8, del mismo modo que el del EBV, se puede detectar en plasma y en células mononucleares de sangre periférica.⁽¹⁴⁷⁾ Sin embargo, su valor en pacientes inmunodeprimidos no está tan estudiado como el del EBV. El valor de la carga viral para la monitorización y seguimiento de pacientes con MCD o PEL es todavía incierto,⁽¹⁴⁸⁾ ya que la mayoría de los estudios en este campo se centran en el rol de la carga viral del HHV8 en la progresión del sarcoma de Kaposi, enfermedad con lesiones visibles en la mayoría de los casos.^(149,150) Además, en ausencia de síntomas inflamatorios sistémicos evidentes por sobreproducción de IL-6 o de sarcoma de Kaposi, parece que la determinación de los niveles plasmáticos de HHV8 no estaría indicada.⁽¹⁵¹⁾

2.2.3 Síndromes linfoproliferativos asociados a HHV8

Clásicamente los síndromes linfoproliferativos asociados a la infección por HHV8 eran la MCD y el PEL. Sin embargo, recientemente se han reconocido nuevas entidades, como el síndrome linfoproliferativo germinotrópico (GLPD) y el DLBCL HHV8 positivo además de describirse diversos casos con hallazgos únicos o de solapamiento entre ellos, lo que sugiere que el espectro de estas lesiones es más amplio que el reconocido hasta el momento. En la tabla 3 se resumen las características clínico-patológicas típicas de los síndromes linfoproliferativos HHV8 positivos.

Tabla 3: Características clínico-patológicas de los principales síndromes linfoproliferativos HHV8 positivos

	MCD	GLPD	PEL	HHV8-DLBCL, NOS
HIV	+	-	+	+
Presentación	- Linfadenopatía generalizada - Esplenomegalia - Síntomas constitucionales	Linfadenopatía localizada	Derrames/ masas tumorales	Enfermedad diseminada con afectación de territorios extranodales
Morfología	- Grados variables de depleción folicular - Plasmablastos en la zona del manto - Plasmocitosis interfolicular	Arquitectura preservada y centros germinales repletos de plasmablastos	Células plasmablasticas en los derrames/ sábanas de plasmablastos	Sábanas de plasmablastos
Fenotipo	Antígenos B +/- IgM λ+ IRF4+ CD138-	Antígenos B- Restricción de cadena ligera λ o κ CD138- CD30+/-	CD45+ Antígenos B- Ig- CD138+/-	Antígenos B +/- IgM λ+ IRF4+ CD138+
HHV8	+	+	+	+
EBV	-	+	+	-
Clonalidad	Policlonal	Policlonal/ Oligoclonal	Clonal	Clonal
Célula de origen	Células B naif	Célula B del centro germinal	Célula B post centro germinal	Células B naif
Mutación de IG	No mutado	Mutación	Mutación	No mutado
Pronóstico	Medio (mejora con nuevos tratamientos)	Buena respuesta al tratamiento	Pobre (pocos meses)	Pobre

Enfermedad de Castleman multicéntrica

Bajo el epónimo de enfermedad de Castleman, se incluyen diversas enfermedades que comparten entre ellas características histológicas pero que sin embargo, tienen etiologías diversas y comportamiento clínico distinto.⁽¹⁵²⁾ Por su asociación a la infección por HIV y su relación con HHV8 nos centraremos solamente en la MCD.

Virtualmente todos los casos de MCD en pacientes HIV positivos se asocian a la infección por HHV8 aunque también existen casos de MCD HHV8 positivos en pacientes HIV negativos. Los pacientes se presentan típicamente con fiebre, sudoración, fatiga, presencia de linfadenopatías, esplenomegalia, citopenias e hipoalbuminemia.⁽¹⁵³⁾ Histológicamente, acostumbran a ser formas mixtas entre la variante hialino-vascular y la plasmocelular. Generalmente la arquitectura ganglionar está preservada y se identifican folículos linfoides con grados variables de involución y centros germinales muy vascularizados con zonas del manto hiperplásicas, en el que destacan células grandes de tipo plasmablastico positivas para HHV8 con expresión de

IgM y restricción de cadena ligera lambda (Figura 8). Los plasmablastos presentes en la zona del manto son positivos para OCT2, BLIMP1 e IRF4, no presentan expresión de PAX5 y típicamente son EBV negativos.⁽¹⁵⁴⁾ La zona interfolicular está ocupada por numerosas células plasmáticas de aspecto maduro y politípicas junto a una vascularización muy prominente. Aunque la proliferación plasmablástica es monotípica, el reordenamiento del gen de las inmunoglobulinas muestra un patrón policlonal y no existe hipermutación somática lo que sugiere un origen en una célula B naif.⁽¹⁵⁵⁾

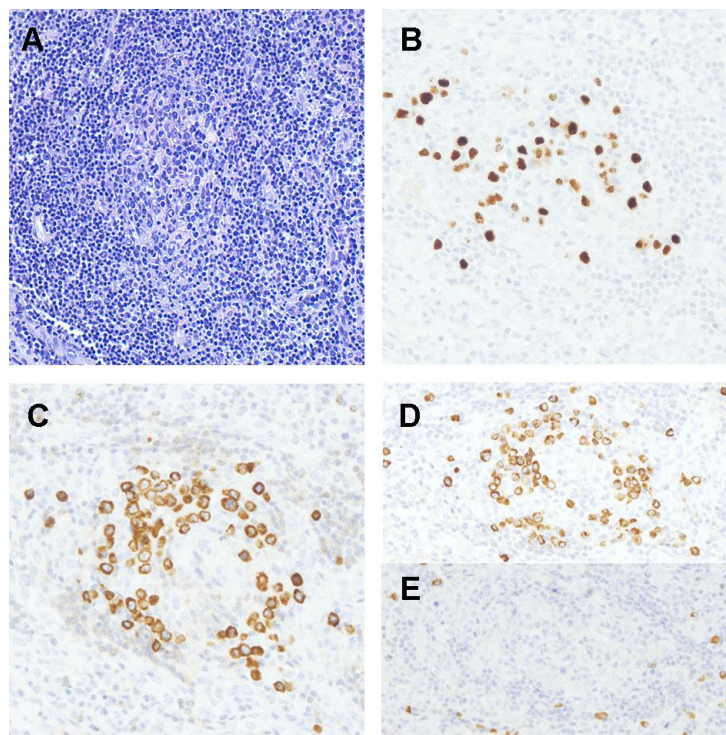


Figura 8: Características histológicas de la enfermedad de Castleman multicéntrica A) Folículos depletivos con marcada vascularización B) Plasmablastos en la zona del manto positivos para HHV8-LANA1; C) Positividad de los plasmablastos para IgM D-E) tinción para cadenas ligeras lambda y kappa respectivamente que muestran restricción de cadena ligera lambda.

En referencia a la naturaleza policlonal pero con restricción lambda de los plasmablastos infectados con HHV8 se han postulado dos hipótesis. O bien existe una tendencia por parte del virus a infectar a células que expresan cadena ligera lambda o bien existe una expansión selectiva de las células lambda en respuesta a la infección viral.⁽¹⁵⁵⁾ Existen evidencias a favor y en contra de ambas hipótesis. La detección de restricción kappa en otros linfomas asociados a HHV8⁽¹⁵⁶⁾ no favorece la primera

hipótesis. Sin embargo, existe un estudio que emplea células amigdalares infectadas por HHV8 *ex vivo* en el que se observaron más células lambda que kappa lo que sugiere una infección preferencial hacia este tipo de células para así establecer la infección latente.⁽¹⁵⁷⁾ Además, en modelos animales la expresión dirigida en células B del gen vFLIP de HHV8, que es un activador de la vía de NF-κB, provoca un aumento de células lambda lo cual apoya que genes como vFLIP también podrían estar implicados en esta expresión preferencial de cadena ligera lambda por las células de la MCD.⁽¹⁵⁸⁾

Aunque el pronóstico de la MCD es pobre, existen estrategias que combinan distintos fármacos como el rituximab, la terapia anti-viral y las terapias anti IL-6 que han demostrado aumentar la supervivencia.^(153,159-165) Por ejemplo, Tocilizumab y Siltuximab son dos inhibidores de la señalización de IL-6 cuyo uso está aprobado para el tratamiento de la MCD idiopática desde 2005 por haber demostrado superioridad clara frente al placebo.⁽¹⁶⁶⁻¹⁶⁸⁾

Enfermedad de Castleman multicéntrica con agregados de plasmablastos

Es conocido en la literatura que existen casos de MCD en que los plasmablastos no están solamente limitados en la zona del manto sino que tienden a formar agregados dentro y fuera de los centros germinales, situación que plantea el diagnóstico de linfoma difuso de células grandes HHV8 positivo. Este hallazgo fue denominado microlinfoma durante varios años.⁽¹⁶⁹⁾ Actualmente la WHO⁽²⁷⁾ ha abandonado el término microlinfoma probablemente por una falta de criterios histológicos claros y por ser un concepto ambiguo desde el punto de vista clínico. Sin embargo, se han descrito situaciones límites desde el punto de vista histológico entre la MCD y el linfoma difuso de células grandes B HHV8 positivo, NOS.

Linfoma difuso de célula grande B HHV8 positivo, NOS

Se trata de una nueva entidad reconocida en la clasificación revisada de la WHO que generalmente se desarrolla en pacientes con historia previa o concomitante de MCD,⁽²⁷⁾ aunque existen casos similares en que no se puede demostrar la existencia de MCD de un modo fehaciente.⁽¹⁷⁰⁾ Su reconocimiento es difícil ya que debido al escaso número de casos y al solapamiento con otras entidades como el PEL extracavitario no existen todavía criterios firmes y reproducibles para su diagnóstico.

Los pacientes acostumbran a presentar los síntomas clínicos de MCD y aunque característicamente afecta a los ganglios linfáticos y/o bazo, puede diseminarse a otras vísceras como hígado, pulmón y tracto gastro-intestinal o incluso en algunos casos presentar expresión leucémica con afectación de sangre periférica.^(169,171) Desde el punto de vista histológico existe una alteración completa de la arquitectura esplénica o nodal por sábanas de células grandes con morfología inmunoblástica/plasmablástica que generalmente acostumbran a tener núcleo excéntrico con uno o dos nucléolos. Estas células son todas positivas para LANA-1 y del mismo modo que ocurre en la MCD los plasmablastos expresan IgM lambda. La hibridación *in situ* para EBV es característicamente negativa. A diferencia del PEL los genes de las inmunoglobulinas no están mutados y se postula que son tumores originados en una célula B-naïf. Es una neoplasia agresiva con mal pronóstico.

Linfoma primario de cavidades

El linfoma primario de cavidades (PEL) es una entidad clínico-patológica que se caracteriza por la proliferación neoplásica de células grandes B en derrames sin masas tumorales evidentes. Es un tumor universalmente asociado a la infección por HHV8.

Aunque puede darse en otros contextos de inmunodeficiencia,^(172,173) el PEL ocurre principalmente en pacientes HIV positivos o en pacientes ancianos en sitios endémicos para el virus como el área mediterránea.⁽¹⁷⁴⁾ Típicamente presenta coinfección por HHV8 y EBV a pesar que este último no es imprescindible para su

diagnóstico. Los pacientes se presentan con derrames en ausencia de linfadenopatías u organomegalias. Aunque la mayoría debutan como enfermedad localizada en las cavidades puede darse extensión a órganos adyacentes bien sea en el momento del diagnóstico de la enfermedad o durante su evolución. Cuando la forma de presentación inicial es en forma de masas tumorales, se utiliza el término PEL extracavitario. Morfológicamente, está formado por células inmunoblásticas o con morfología anaplásica con núcleos grandes hiperlobulados, nucléolo evidente y citoplasma amplio. Inmunofenotípicamente, tienden a perder la expresión de marcadores de línea B como CD20, CD79a o PAX5 y no expresan inmunoglobulinas de superficie. Pueden expresar de forma variable CD30, EMA, CD138 y CD38 y expresar de manera aberrante marcadores de línea T. Los genes de las inmunoglobulinas están reordenados y presentan hipermutación somática, lo cual sugiere que la célula de origen es una célula post centro germinal. Existen múltiples alteraciones genéticas descritas, como las ganancias en el cromosoma 12 y X, lo que apoya que hay otros eventos genéticos involucrados en la patogénesis además del HHV8. El pronóstico es pobre con una supervivencia media inferior al año. Se han descrito casos anecdóticos con respuestas a tratamientos quimioterápicos y/o modulación inmune.⁽¹⁷⁵⁾

Síndrome linfoproliferativo germinotrópico

Los síndromes linfoproliferativos germinotrópicos (GLPD) se describieron por primera vez en el año 2002⁽¹⁷⁶⁾ y desde entonces se han descrito solamente 14 casos (Tabla 4).⁽¹⁷⁶⁻¹⁸⁶⁾ Aunque existen unas características comunes, los casos descritos son pocos y además hay evidencia que pueden haber casos de GLPD con características clínicas o histológicas poco convencionales.^(180,185)

Los GLPD afectan típicamente a pacientes HIV negativos y se presentan como enfermedad localizada en la región de cabeza y cuello.⁽¹⁷⁶⁾ Histológicamente se observa preservación global de la arquitectura nodal. La población neoplásica está limitada a los centros germinales que se encuentran reemplazados por células de tipo plasmablástico. Los folículos no afectados pueden ser regresivos y simular una MCD.

Típicamente existe plasmocitosis interfolicular con aumento de la vascularización. Los plasmablastos neoplásicos presentan de forma característica coinfección por EBV y HHV8 y tienen restricción de cadenas ligeras (kappa o lambda). Los marcadores CD20, CD79a, CD138, BCL6 y CD10 tienden a ser negativos con expresión variable de CD30. El marcador que se expresa de manera más constante es IRF4. A pesar de que en la mayoría de los casos se consigue demostrar restricción de cadenas ligeras, el reordenamiento del gen de las inmunoglobulinas suele ser policlonal, probablemente debido a que normalmente la población neoplásica representa solamente una pequeña proporción de la población linfoide nodal. Los blastos en los GLPD tienen mutaciones somáticas y variación interclonal de los genes de las inmunoglobulinas, lo que apoya un origen en las células B del centro germinal.⁽¹⁷⁶⁾ Aunque la mayoría de casos responden bien a la quimioterapia o a la radiación, existen casos descritos con evolución a linfoma difuso de célula grande B.^(180,185) Este hallazgo refuerza la idea de que representan un espectro más amplio de lo que actualmente está establecido.

Síndrome inflamatorio por producción de citocinas asociado a HHV8

KICS es la abreviatura empleada para referirse al síndrome inflamatorio por producción de citocinas asociado al HHV8. Este síndrome, que no se encuentra en la clasificación de los síndromes linfoproliferativos asociados a HHV8 de la WHO, se describió en 2010^(27,187) a partir de la observación de que algunos pacientes sin evidencia histológica de MCD presentaban síntomas y hallazgos de laboratorio similares a los pacientes con evidencia histológica de MCD. Ahora conocemos que estos síntomas se explican por la sobreproducción de citocinas, particularmente la vIL-6 por parte de las células infectadas por el virus. Estos pacientes tienen una carga viral y niveles séricos de IL-6 viral y humana elevados pero no evolucionan a MCD. El sustrato histológico de este síndrome no está bien caracterizado. Algunos de estos pacientes se recuperan de su enfermedad con tratamiento antirretroviral y otros fallecen por evolución a sarcoma de Kaposi o por infecciones intercurrentes.

Tabla 4: Características clínico-patológicas de los casos publicados de síndromes linfoproliferativos germinotrópicos

Fuente	Edad, género	ID	Características clínicas			Seguimiento, Evolución	Marcadores de células B	Inmunofenotipo			Molecular
			Presentación	Tratamiento	IRF4/MUM1			K/L	VEB/HHV8	IGHV	
Du'02 ⁽¹⁷⁶⁾	41,M	VHC	Ganglios linfáticos axilares y cervicales, 6 años evolución	CHOPx6	SEE, 7 años	CD20- CD79a- CD138- CD38-	ND	L	+/+	Pico dominante	
Du'02 ⁽¹⁷⁶⁾	61,M	No	Ganglios linfáticos submandibular e inguinal, 4 años evolución	RT	SEE, 15 años	CD20- CD79a- CD138- CD38+	ND	L	+/+		
Du'02 ⁽¹⁷⁶⁾	63,F	No	Ganglio linfático inguinal y para aórtico		ND	CD20- CD79a- CD138- CD38+	ND	K	+/+	Policlonal	
Seliem'07 ⁽¹⁸⁵⁾	45,M	HIV	Linfadenopatía generalizada, derrames, EMG, síntomas B y leucemización	Prednisona ATB Ciclofosfamida	Fallecido por Enfermedad	CD20 focal	+	L	+/+	Policlonal	
D'Antonio '07 and'11 ^(181,182)	60,M	No	Ganglio linfático laterocervical y síntomas B	No	SEE, 7 años	CD20-, CD79a- CD138-	+	K	+/+	Policlonal	
Oh'11 ⁽¹⁸³⁾	75,M	EPOC	Ganglio linfático submandibular	CHOPx4	SEE, 19 meses	CD20-, CD79a- CD138+		K	+/+	Policlonal	
Courville'14 ⁽¹⁸⁰⁾	63,F	VHC, VHB	Ganglio linfático mesentérico y anemia hemolítica		Progresión a linfoma EBV+/HHV8+ SEE,13 meses	CD20-, CD79a- PAX5-, CD138-	+	L	+/+		
Taris'14 ⁽¹⁸⁶⁾	49,F	No	Masa cervical de crecimiento lento, 4 meses de evolución junto otros ganglios linfáticos aumentados de tamaño	RT	SEE, Más de 1 año	CD20-,CD79a- PAX5-,CD138-, CD38+débil	+	L	+/+	Policlonal	
Papoudou-Bai'15 ⁽¹⁸⁴⁾	53,M	No	Ganglio linfático cervical y supraclavicular	ND	ND	CD79a-, CD38- CD138-	+		+/+		
Bhavsar'17 ⁽¹⁷⁸⁾	84,F	No	Linfadenopatía generalizada	R-CHOPx6	SEE, 6 meses	CD20-, CD79a- PAX5-, CD138-	+	No expresión	+/+	Policlonal	
Bhavsar'17 ⁽¹⁷⁸⁾	58,M	No	Masa axilar de crecimiento lento, 10 años de evolución	Cirugía	DLBCL EBV+/HHV8- y fallecimiento	CD20-, PAX5-	+		+/+		
Bacha'17 ⁽¹⁷⁷⁾	78. F	VHC	Adenopatías inguinales	No tratamiento	ND	CD20-,CD138+ CD38+	ND	K	+/+	Policlonal	
SH2015-27 ⁽¹⁷⁹⁾	84	No	Ganglio linfático	ND	ND	CD20-, CD79a-, CD138-	ND	K=L	+/+	ND	
SH2015-358 ⁽¹⁷⁹⁾	60	No	Ganglio linfático	No tratamiento	Indolente con linfadenopatía estable tras 1 año de seguimiento	CD20-, CD79a-, CD138-	ND	No expresión	+/+	ND	

M indica masculino; F: femenino; EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica; VHC: virus hepatitis C; VHB: virus hepatitis B; EMG: esplenomegalia; CHOP: ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, prednisona; RT: radioterapia; SEE: sin evidencia de enfermedad; ND: no disponible; L: lambda; K: kappa

3. DIFERENCIACIÓN PLASMOCELULAR Y ONCOGÉNESIS ASOCIADA A VIRUS HERPES

3.1. Mecanismos de diferenciación plasmocelular de las células B maduras.

3.1.1 Diferenciación plasmocelular T independiente

Algunos antígenos pueden activar las células B directamente sin la participación de las células T. Cuando las células B naif encuentran el antígeno, se transforman en células blásticas proliferantes que madurarán a células plasmáticas de vida corta sin generarse células de memoria. Estas células plasmáticas son productoras de IgM y serán las responsables de la respuesta inmune primaria. Los anticuerpos generados en este tipo de respuesta tienen una afinidad más baja por el antígeno que los generados por la respuesta dependiente, ya que no existe el proceso de hipermutación somática de los genes de la inmunoglobulina.⁽¹⁸⁸⁾

3.1.2 Diferenciación plasmocelular T dependiente. Reacción de centro germinal

Los ganglios linfáticos son el lugar principal de maduración de la afinidad y de la expansión de la respuesta inmune adaptativa. Antes de entrar en los centros germinales, las células B naif circulan en la sangre periférica y entran en las zonas ricas en células T perivasculares del bazo y en los mantos de los centros germinales de los ganglios linfáticos. Aparte de las células plasmáticas de vida corta generadas mediante la respuesta T independiente, existen células B que no se diferencian directamente a células plasmáticas sino que deben formar centros germinales en los que tiene lugar un complejo conjunto de reacciones durante diversos días. Al contactar con el antígeno presentado por las células dendríticas las células B inician la reacción de

centro germinal (Figura 9)⁽¹⁸⁹⁾ y experimentan una rápida proliferación acompañada de la hipermutación de la región variable del gen de la cadena pesada de las inmunoglobulinas (IgHV) reordenada, así como de la activación de la maquinaria de recombinación somática que conduce al cambio de isotipo de inmunoglobulina. Solamente las células que expresen un anticuerpo de superficie (BCR, del inglés *B-cell receptor*) con suficiente afinidad por el antígeno conseguirán hacer frente a la maquinaria de respuesta al daño genómico que se activa durante estos procesos de edición de los genes de las inmunoglobulinas y así no entrar en apoptosis. Los ciclos repetidos de proliferación/mutación y selección de clones conducen a la expresión de un BCR “maduro” de suficiente afinidad en la superficie citoplasmática. La recombinación de los isotipos también ocurre en el centro germinal. Unos 10-12 días post-inmunización la reacción de centro germinal llega a su máximo. Cuando los centros germinales se disipan, se generan células B de memoria y plasmablastos secretores de anticuerpos que posteriormente se diferenciarán a células plasmáticas. Es crucial que la diferenciación terminal no ocurra antes de la maduración de afinidad y la recombinación de isotipo para que las células de memoria y las células plasmáticas sean de alta afinidad.

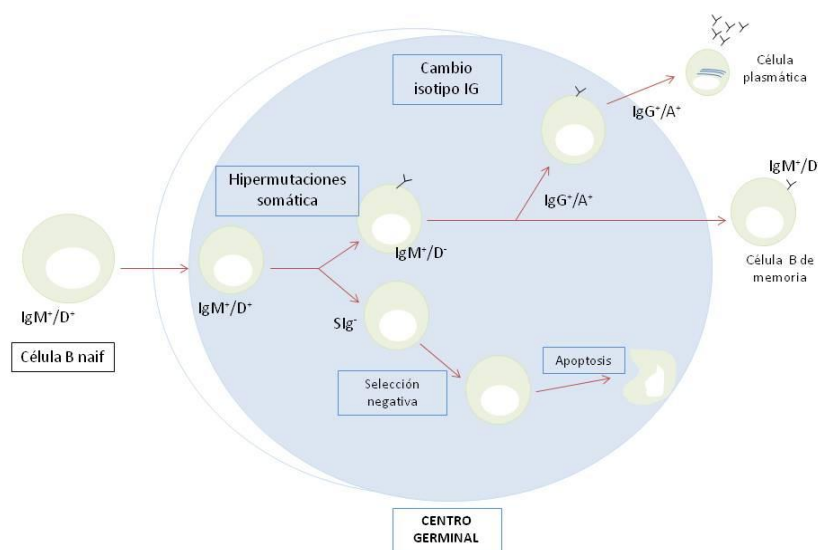


Figura 9: Diferenciación plasmocelular. Reacción de centro germinal.

Este proceso está controlado por múltiples mecanismos y distintos genes que actúan a diferentes niveles. PAX5 y BCL6, son dos factores de transcripción implicados en inhibir la diferenciación terminal de la célula B durante la reacción de centro germinal. También es importante destacar el papel que juega XBP1. XBP1 fue el primer factor de transcripción identificado como necesario para la diferenciación plasmacítica. Diversos estudios con ratones knockout revelan que es indispensable para el desarrollo de los órganos secretores como el hígado y que se expresa a altos niveles en las células plasmáticas. Los ratones quiméricos *xbp1*^{-/-}, *rag2*^{-/-} permiten delecionar el gen exclusivamente en las células B. Estos ratones son capaces de desarrollar linfocitos B que pueden proliferar e incluso desarrollar centros germinales, no obstante tienen marcadamente disminuida su capacidad de secretar inmunoglobulinas tanto *in vitro* como *in vivo* en respuesta a estímulos de diferenciación. Además, no desarrollan células plasmáticas lo que sugiere que XBP1 es importante para la diferenciación plasmocelular.

XBP1: diferenciación plasmocelular y respuesta al estrés del retículo endoplasmático

El retículo endoplasmático (RE) es un compartimiento dinámico donde tiene lugar el plegamiento y el control de calidad de las proteínas sintetizadas. Las proteínas deben estar correctamente plegadas y ensambladas para cumplir con sus funciones asignadas por el código genético. Las células han desarrollado sistemas para solucionar los errores de plegamiento proteico que se ponen en marcha cuando las proteínas mal plegadas se acumulan en el RE. Las células eucariotas atenúan la translación para disminuir el volumen en la maquinaria de plegamiento y también inducen la transcripción de proteínas chaperonas localizadas en el RE para aumentar la capacidad de plegamiento. Esta compleja vía adaptadora que regula la homeostasis del RE y que permite a la célula manejarse con gran cantidad de proteínas se conoce como “vía de estrés del retículo endoplasmático o en inglés *unfolded protein response*” (ERE/UPR). Uno de los principales moduladores de esta respuesta es precisamente XBP1, un

potente factor de transcripción que regula la expresión de genes que aumentan la capacidad del sistema de plegado de proteínas o la degradación de proteínas mal plegadas. La expresión de XBP1 es necesaria para que las células B cambien el programa de diferenciación a células plasmáticas secretoras de inmunoglobulina. Durante el proceso de diferenciación plasmocelular la señalización de la UPR activa XBP1⁽¹⁹⁰⁾ para controlar los cambios que deben tener lugar en el RE necesarios para la síntesis de anticuerpos. Como se ha mencionado anteriormente, tanto *in vitro* como en modelos animales se ha demostrado que los linfocitos sin expresión de XBP1 pueden formar centros germinales pero no son capaces de generar células plasmáticas ni producción de inmunoglobulinas, remarcando el papel esencial de XBP1 en la diferenciación B terminal.⁽¹⁹¹⁻¹⁹⁴⁾ La expresión nuclear de XBP1 mediante inmunohistoquímica es un marcador que puede sustituir de manera fiable la activación de XBP1 y, en linfomas B-agresivos se ha asociado a peor pronóstico.⁽¹⁹⁵⁾

3.2. Papel de la diferenciación plasmocelular en la reactivación de la infección por virus oncogénicos

Desde hace varios años se ha sugerido que la replicación de EBV está asociada con la diferenciación terminal de la célula B.⁽¹⁹⁶⁾ El virus normalmente establece la infección latente en las células B de memoria. El cambio entre fase latente y lítica está mediada por dos proteínas virales BZLF1 y BRLF1 que no se expresan en las células infectadas latentemente. Diversos estudios señalan que tanto la activación de las vías de estrés del retículo (ERE/UPR) como la propia expresión de XBP1 juegan un papel esencial en la replicación viral ya que activan la transcripción de los genes de fase lítica como BZLF1/ZEBRA.^(197,198) Además, otros factores de transcripción propios de células B maduras que se pierden con la diferenciación terminal como PAX5 han demostrado ser potentes inhibidores de la función de los genes de replicación viral mediante promoción de los estados de latencia.^(199,200) También se ha estudiado la relación entre

diferenciación plasmocelular y replicación de HHV8. En este caso, el cambio entre fase de latencia y lítica está mediado por RTA (ORF50). Es conocido que XBP1 se asocia específicamente al promotor de ORF50 y activa su expresión con la consiguiente entrada en la fase lítica del virus.^(201,202) Sin embargo, hallazgos más recientes también apuntan que XBP1 se puede unir y activar directamente al promotor de la IL-6 viral,⁽²⁰³⁾ otro gen generalmente expresado en fase lítica. A diferencia de la IL-6 humana, la IL-6 viral se une a los receptores dentro del retículo endoplasmático, y produce efectos dentro de la célula en la que se produce.⁽²⁰⁴⁾ La región promotora de vIL-6 contiene varios elementos potenciales de respuesta XBP, que son en gran parte los que median el efecto activador de XBP1.

A pesar de estas evidencias que relacionan replicación viral y diferenciación plasmocelular, no existen estudios que lo analicen en tejidos de muestras humanas.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis de trabajo

Los síndromes linfoproliferativos asociados a inmunodeficiencias secundarias son un grupo heterogéneo de enfermedades que comparten unas características comunes como la infección por virus herpes oncogénicos y la diferenciación plasmocelular.

Los principales herpes virus oncogénicos son el virus de Epstein-Barr y el virus herpes tipo 8. Éstos se caracterizan por tener una fase lítica y una de latencia. Ambas fases son inmunogénicas y por tanto influenciadas por la inmunidad del huésped. Se creía que sólo la fase de latencia era oncogénica aunque ahora sabemos que la fase lítica también puede inducir linfomagénesis. La fase lítica de los virus herpes oncogénicos se reactiva con la vía de estrés de retículo endoplasmático (ERE/UPR) que además regula la diferenciación plasmocelular. De manera, que la replicación viral y la diferenciación plasmocelular convergen en esta vía.

Se han identificado lesiones iniciales y precursoras de los síndromes linfoproliferativos asociados al virus de Epstein-Barr que configuran un espectro que abarca desde hiperplasias linfoides a linfomas. Sin embargo, el espectro de los síndromes linfoproliferativos asociados a virus herpes 8 no está bien caracterizado y no se conoce si existen lesiones precursoras.

En esta tesis doctoral nos centramos en el estudio de los síndromes linfoproliferativos post-trasplante y las proliferaciones linfoides relacionadas con el virus herpes tipo 8 con las siguientes hipótesis:

1. La fase lítica viral es altamente inmunogénica y sólo debería ser tolerada en los pacientes más inmunodeprimidos y por ende, más en riesgo de progresión de su síndrome linfoproliferativo. Además, sólo durante la fase lítica son efectivas las terapias antivirales. La identificación de la fase lítica de EBV en PTLD permitiría identificar pacientes de alto riesgo que podrían beneficiarse de terapias antivirales. Estos pacientes podrían estar más inmunosuprimidos y por tanto presentar más

coinfecciones por otros herpes virus oportunistas como citomegalovirus y/o tener formas más agresivas de la enfermedad.

2. El análisis sistemático de la infección por virus herpes tipo 8 en lesiones reactivas y neoplásicas en pacientes inmunodeprimidos permitiría determinar el espectro de los síndromes linfoproliferativos asociados a este virus de forma similar a lo observado en asociación a EBV. Esto facilitaría reconocer lesiones iniciales, presentaciones atípicas y nuevas lesiones previamente no caracterizadas debido a su baja frecuencia.

Objetivo general

Definir las características clínico-biológicas de dos síndromes linfoproliferativos asociados a inmunodeficiencia poco frecuentes y que están relacionados con la infección por virus herpes oncogénicos: los síndromes linfoproliferativos post-trasplante usualmente asociados a infección por EBV y las proliferaciones linfoides asociadas a infección por HHV8. Definir también su heterogeneidad clínica y evolutiva e identificar variables pronósticas que permitan seleccionar pacientes de riesgo que puedan beneficiarse de tratamientos específicos.

Objetivos específicos

Primer trabajo

1. Estudiar si es posible la identificación de replicación de EBV en PTLD y su posible asociación con características clínicas y patológicas específicas.

1.1 Analizar la relación de las fases latente y lítica de EBV con los hallazgos histopatológicos.

1.2 Correlacionar la expresión de genes de latencia y replicación altamente inmunogénicos con parámetros que afecten al grado de inmunosupresión de estos pacientes: incidencia de rechazos, enfermedad injerto contra huésped e infecciones oportunistas por citomegalovirus.

1.3 Caracterizar la activación basal de la vía de estrés del retículo endoplasmático mediante la expresión de XBP1 y analizar su posible asociación con la replicación viral y los parámetros clínicos.

1.4 Identificar factores pronósticos.

Segundo trabajo

2. Determinar si las proliferaciones linfoides asociadas a la infección por virus herpes tipo 8 configuran un espectro de lesiones que abarcan desde procesos reactivos a auténticos linfomas de forma similar a lo que sucede con las lesiones asociadas a virus de Epstein-Barr.

2.1 Reconocer lesiones iniciales y/o procesos reactivos asociados a infección por virus herpes tipo 8 y establecer su riesgo de evolución a síndromes linfoproliferativos.

2.2 Reclasificar casos que supongan un problema diagnóstico por su presentación clínica atípica o su cuadro histológico solapado.

2.3 Establecer criterios histológicos que permitan distinguir las distintas lesiones asociadas a virus herpes tipo 8.

2.4 Definir nuevas lesiones asociadas a infección por virus herpes tipo 8 no reconocidas actualmente.

RESULTADOS

Primer trabajo

In vivo intratumoral Epstein–Barr virus replication is associated with XBP1 activation and early-onset post-transplant lymphoproliferative disorders with prognostic implications

Blanca Gonzalez-Farre, Jordina Rovira, Daniel Martinez, Alexandra Valera, Adriana Garcia-Herrera, Maria Angeles Marcos, Carla Sole, Gael Roue, Dolors Colomer, Elena Gonzalvo, Imma Ribera-Cortada, Monica Araya, Josep Lloreta, Luis Colomo, Elias Campo, Armando Lopez-Guillermo and Antonio Martinez

Resumen

Los PTLD son una complicación poco frecuente, aunque bien reconocida de los trasplantes de órganos sólidos y de médula ósea. Representan un espectro de proliferaciones linfoides caracterizadas en su mayoría por la proliferación de linfocitos B con grados variables de diferenciación plasmocelular asociadas a la infección por el VEB. Aunque el efecto oncogénico del virus se relaciona principalmente con la infección latente, la fase lítica tiene también un papel destacado en la linfomagénesis. *In vitro*, la replicación de EBV se asocia a diferenciación plasmocelular y a la activación de XBP1, un fenómeno que no se ha observado *in vivo*.

En este trabajo, estudiamos las fases lítica y de latencia de la infección viral en una serie de 35 pacientes adultos con PTLD (26H/9M, edad media 54 años), así como la diferenciación plasmocelular. Para la fase de latencia utilizamos EBER, LMP1 y EBNA2. El análisis de la fase lítica lo realizamos mediante el estudio de BZLF1/ZEBRA y BMRF1/EADE31. La diferenciación plasmocelular se ha estudiado mediante la expresión nuclear de XBP1.

La infección por EBV se observó en 28 (80%) casos y las latencias más frecuentes fueron la II y III ya que se detectaron en 22 (79%) casos. La replicación de EBV se detectó en 17 (60%) de los casos. De éstos, 11/12 casos evaluables presentaban activación de XBP1 y expresión citoplasmática intensa de inmunoglobulinas compatible

con diferenciación plasmocelular. Curiosamente, la combinación de infección con latencia tipo III y replicación viral identificó un subgrupo de pacientes de alto riesgo con una menor supervivencia (supervivencia global al año 18% vs 48%) y un desarrollo más temprano del PTLD (mediana de 7 vs 26 meses). Además, estos pacientes parecen estar más inmunosuprimidos ya que tienen menores tasas de rechazo y de enfermedad de injerto contra huésped pero mayor incidencia de reactivación de citomegalovirus.

En conclusión, la replicación de EBV en PTLD se asocia con diferenciación plasmocelular y activación de XBP1 y tiene implicaciones pronósticas. Tanto la latencia III como la infección lítica se relacionan con una mayor agresividad y un desarrollo más temprano de los síndromes linfoproliferativos post-trasplante.

Este trabajo sugiere que el estudio inmunohistoquímico concomitante de los genes de fase lítica y de latencia en la práctica clínica permite seleccionar pacientes de alto riesgo que podrían beneficiarse de nuevas terapias dirigidas y con menor toxicidad como por ejemplo los tratamientos antivirales.

***In vivo* intratumoral Epstein–Barr virus replication is associated with XBP1 activation and early-onset post-transplant lymphoproliferative disorders with prognostic implications**

Blanca Gonzalez-Farre^{1,8}, Jordina Rovira^{2,8}, Daniel Martinez¹, Alexandra Valera¹, Adriana Garcia-Herrera¹, Maria Angeles Marcos³, Carla Sole⁴, Gael Roue⁴, Dolors Colomer^{1,4}, Elena Gonzalvo¹, Imma Ribera-Cortada^{1,5}, Monica Araya⁶, Josep Lloreta⁷, Luis Colomo¹, Elias Campo¹, Armando Lopez-Guillermo^{2,9} and Antonio Martinez^{1,9}

¹Department of Pathology, Hospital Clínic, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), University of Barcelona, Barcelona, Spain; ²Hematology Unit, Hospital Clínic, University of Barcelona, Barcelona, Spain; ³Department of Microbiology, Barcelona Centre for International Health Research (CRESIB), Hospital Clínic, University of Barcelona, Barcelona, Spain; ⁴Experimental Therapy in Lymphoid Malignancies Group, Institut d'Investigacions Biomèdiques Agusti Pi i Sunyer (IDIBAPS), University of Barcelona, Centre Esther Koplowitz, Barcelona, Spain; ⁵Department of Pathology, Hospital Nostra Senyora de Meritxell, Escaldes-Engordany, Principat d'Andorra, Spain; ⁶Department of Pathology, Hospital San Juan de Dios, San José, Costa Rica and ⁷Department of Pathology, Hospital del Mar, Institut Municipal d'Investigacions Mèdiques (IMIM), Autonomous University of Barcelona, Barcelona, Spain

Post-transplant lymphoproliferative disorders are life-threatening complications following hematopoietic or solid organ transplantation. They represent a spectrum of mostly EBV-driven lymphoplasmacytic proliferations. While the oncogenic effect of EBV is related to latent infection, lytic infection also has a role in lymphomagenesis. *In vitro*, EBV replication is linked to plasma cell differentiation and XBP1 activation, although this phenomenon has never been addressed *in vivo*. We analyzed for the first time latent and lytic intratumoral EBV infection in a series of 35 adult patients with a diagnosis of post-transplant lymphoproliferative disorder (26M/9F, median age 54 years). A complete EBV study was performed including the analysis of the latent EBER, latent membrane protein-11, and EBV nuclear antigens as well as the immediate-early BZLF1/ZEBRA and early BMRF1/EADE31 lytic genes. XBP1 activation was assessed by nuclear protein expression. EBV infection was observed in 28 (80%) cases being latency II and III the most frequently observed 22 (79%). Intratumoral EBV replication was detected in 17 (60%) cases. Among these, XBP1 activation was observed in 11/12 evaluable cases associated with strong cytoplasmic immunoglobulin expression consistent with plasma cell differentiation. Intriguingly, the combination of latency III infection and EBV replication identified a high-risk subgroup of patients with significantly shorter survival (overall survival at 1 year 18% vs 48%) and early-onset (median of 7 vs 26 months) post-transplant lymphoproliferative disorder. Moreover, these patients appear to be more heavily immunosuppressed, so they exhibit lower rates of rejection and graft vs host disease but higher rates of cytomegalovirus reactivation. In conclusion, EBV replication is associated with plasma cell

Correspondence: Dr A Martinez, MD, PhD, Department of Pathology, Hospital Clínic, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), University of Barcelona, Villarroel 170, E3/5P, 08036 Barcelona, Spain.
E-mail: antonmar@clinic.ub.es

⁸These authors contributed equally to this work.

⁹AM and AL-G are the senior authors of the manuscript.

Received 12 December 2013; accepted 25 February 2014; published online 25 April 2014

differentiation and XBP1 activation with prognostic implications. Both latency III and lytic EBV infection are related to aggressive and early-onset post-transplant lymphoproliferative disorder. These results suggest that immunohistochemical study of latent and lytic EBV genes in the clinical practice may help to select higher-risk patients to new therapies including antiviral treatments.

Modern Pathology advance online publication, 25 April 2014; doi:10.1038/modpathol.2014.68

Keywords: EBV; lymphoproliferative; plasma cell differentiation; post-transplant; replication; xbp1

Post-transplant lymphoproliferative disorders are lymphoid or plasmacytic proliferations that arise in the setting of immunosuppression following hematopoietic stem cell or solid organ transplantation.^{1,2} They represent a clinical and histopathological spectrum of disorders ranging from lesions with an excellent prognosis by reducing immunosuppressive treatments, to an overt aggressive lymphoma that requires immunochemotherapy.³ Although the incidence of post-transplant lymphoproliferative disorders is rising, probably due to the increasing number of transplant recipients and the longer survival of patients, the studies on series are short and heterogeneous. At present, no reliable morphologic, phenotypic, or genotypic marker has been identified to predict the outcome of patients in terms of response or survival.⁴

EBV infection is associated with more than 80% of B cell post-transplant lymphoproliferative disorders.^{5–8} Nevertheless, the assessment of the EBV infection latency program is not consistently done throughout and even EBV status is unknown in up to 30% of the patients in some recently published series.^{9,10} EBV infection drives blastic transformation and uncontrolled proliferation in B cells mediated by constitutive expression of a limited set of latent viral genes, which are all oncogenic.^{3,5} In immunodeficient patients, all latent genes are expressed in a full growth-transforming program often found in these lymphomas, also known as latency III.^{7,11–13}

Besides a latent stage, EBV infection has a lytic or replicative phase, which is characteristic of infectious mononucleosis and hairy oral leukoplakia. Very recently, a role for EBV replication in lymphomagenesis has also been proposed.^{3,14} Following infection with a lytic replication-defective EBV strain, humanized mice developed fewer post-transplant lymphoproliferative disorder-like lymphomas than wild-type EBV-infected mice,¹⁴ highlighting the importance of lytic phase in the development of the disease.

Immediate-early BZLF1/ZEBRA lytic gene expression is induced *in vitro*, following plasma cell differentiation and activation of the plasma cell-associated transcription factor XBP1.^{15,16} Nuclear XBP1 expression is a reliable marker of XBP1 activation and has been associated with poor prognosis in aggressive B-cell lymphomas,¹⁷ although its role in post-transplant lymphoproliferative disorders has never been addressed before.

Immediate-early BZLF1/ZEBRA and early BMRF1/EADE31 viral genes initiate the lytic phase and their expression in EBV-infected tumor cells has been used to detect EBV replication in mice and human lymphomas.^{14,18}

Both the growth-transforming and the replication programs are highly immunogenic stages of EBV infection that may be only tolerated in deeply immunosuppressed individuals. A systematic study of these different EBV latent and lytic programs in tumor cells has not been performed yet in patients with post-transplant lymphomas.

Reduction of immunosuppressive treatment and antiviral replication therapies are used in the clinical management of patients with post-transplant lymphoproliferative disorders.^{4,9,18–20} However, the decision to treat and the type of therapy a patient receives largely rely only on clinical features such as: current dosing, type of allograft, history of rejection, or infections. Thus, the effect of antiviral therapies is very controversial probably due to not considering the amount of intratumoral viral load and the EBV replication stage in the decision to treat a patient.¹⁸

In this study, we analyzed for the first time the role of both latent and lytic intratumoral EBV infection programs in a series of primary samples of post-transplant lymphoproliferative disorders, as well as the importance of plasma cell differentiation through the study of XBP1 in this group of patients.

Materials and methods

Patients and Samples

Thirty-five adult patients (26 males/9 females; median age of 54 years) diagnosed with post-transplant lymphoproliferative disorders at Hospital Clínic between 2000 and 2011 with available tissue biopsies were the subject of this study. Main clinical information was collected including type of transplant, time to lymphoma development, site of involvement, treatment, response, and follow-up. Main clinicobiological characteristics of the 35 patients are summarized in Table 1.

Cases were reviewed by three pathologists (AM, EC, BG-F) and classified according to the 2008 WHO classification.¹

The study was performed according to the guidelines of the Ethic committee of Hospital Clínic de Barcelona.

Table 1 Main clinicobiological characteristics of 35 patients with PTLD

Age, years (median, range)	54 (26–77)
Gender (male/female)	26/9
<i>Transplanted organ</i>	
H SCT	12 (34%)
Solid organ transplantation	23 (66%)
Kidney	11 (31%)
Liver	7 (20%)
Heart	5 (15%)
<i>Immunosuppressant therapy</i>	
Cyclosporine	24 (75%)
Mycophenolate mophetil	16 (50%)
Receptor EBV-positive serology	27 (93%)
Organ rejection/GVHD	21 (65%)
CMV reactivation	12 (39%)
<i>Time transplant to PTLD</i>	
< 1 year (early-onset PTLD)	12 (34%)
> 1 year (late-onset PTLD)	23 (66%)
<i>Histological subtype</i>	
Polymorphic PTLD	6 (17%)
Monomorphic PTLD	
DLBCL	26 (74%)
Plasmacytoma-like PTLD	1 (3%)
Hodgkin lymphoma-type PTLD	2 (6%)
<i>ECOG at lymphoma diagnosis</i>	
0	19 (59%)
1	9 (28%)
2	4 (13%)
3–5	0
B symptoms	19 (60%)
<i>Ann Arbor Stage</i>	
I	10 (31%)
II	9 (28%)
III	0
IV	13 (41%)
Transplanted organ dysfunction	10 (31%)
Transplanted organ involvement	6 (17%)
CNS involvement	7 (22%)
High serum LDH	23 (72%)
High serum β 2m	19 (95%)

Abbreviations: CNS, central nervous system; DLBCL, diffuse large B-cell lymphoma; EBV, Epstein–Barr virus; H SCT, hematopoietic stem cell transplantation; PTLD, post-transplant lymphoproliferative disorder.

Epstein–Barr Virus and Immunophenotypic Studies

Epstein–Barr virus (EBV) was detected using *in situ* hybridization with EBER probes (INFORM EBER, Roche Diagnostics, Basel, Switzerland). Immunohistochemical studies were also performed for the detection of latency proteins: latent membrane protein-1 (LMP-1) (clone CS1-CS5, Dako, Glostrup, Denmark), EBV nuclear antigen-2 (EBNA-2) (clone EP2, Leica Biosystems, Newcastle, United Kingdom) and lytic genes: BZLF1/ZEBRA (Argene, AZ-69, Varilhes, France) and BMRF1/EADE31 (clone G3-E31, Leica Biosystems, Newcastle, United Kingdom) as described elsewhere.²¹ The activation of the plasma cell-related transcription factor XBP1s

(Xbp-1-M186, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) was analyzed as previously described.¹⁷ A cutoff of 30% of nuclear positivity was used to be considered positive.

EBV DNA was isolated from plasma, cerebrospinal fluid or tissue with QIASymphony Virus/Bacteria Midi kit (Qiagen, Hilden, Germany). EBV quantification was performed with EBV Q-PCR Alert AmpliMIX (Nanogen Advanced Diagnostics, Torino, Italy) and ABI PRISM 7300 platform (PE Applied Biosystems, Foster City, CA). The limit of detection is 10 copies/reaction.

Western Blot

Frozen tumor samples were lysed in a non-denaturing detergent (M-PER and T-PER, Pierce, Rockford, IL) containing protease inhibitors (Complete Mini, Roche) and phosphatase inhibitors (Cocktails 1 and 2, Sigma, Saint Louis, MO) as previously described.¹⁷ Nitrocellulose membranes were incubated with mouse anti BZLF1 (LsBio) and mouse anti- α -actin (Sigma, St Louis, MO) as a loading control. Binding was detected using an enhanced Chemoluminescent Supersignal-FEMTO (Pierce). Visualization and image analysis were performed in a mini LAS-4000 camera system (Fuji Photo Film, Minato-Ku, Tokyo, Japan). Protein quantification was done with Image Gauge Software (Fujifilm, Düsseldorf, Germany).

Fluorescence ‘*In Situ*’ Hybridization

MYC (8q24), *BCL-2* (18q21), and *BCL-6* (3q26) gene status was studied by fluorescence ‘*in situ*’ hybridization (FISH) performed on 3–4- μ m thick sections of formalin-fixed paraffin-embedded tissues, using dual color-break apart probes (Abbott Molecular, Illinois) as described.²²

IgH Gene Rearrangements

DNA for the study of *IGHV* gene rearrangements was extracted from tissue sections using the QIAamp DNA mini kit (Qiagen). Purified DNA was amplified using primers of the Framework Regions 1 and 3 (FR-1 and FR-3) and JH alpha regions of the immunoglobulin heavy chain gene (IgH-PCR), using the BIOMED2 protocol.²³

Assessment of Response and Outcome

Complete response was defined as the total disappearance of tumor masses and any other detectable clinical evidence of disease and disease-related symptoms for at least 1 month. Partial response was considered when tumor mass or organ infiltration decreased by at least 50% along with the disappearance of disease-related symptoms. Patients not

included in these categories and early deaths were considered as non-responders. Disease relapse or progression was defined as the appearance of new symptoms or signs of the disease as demonstrated by lymph node biopsy or other appropriate studies.²⁴ To consider solid organ rejection or graft vs host disease, along with clinical suspicion, histologic evidence of organ injury was needed. Cytomegalovirus reactivation was considered when any viral load is detected in peripheral blood during post-transplant period.

Statistical Methods

Differences among the subgroups of patients were assessed by using the χ^2 test (two-tailed), the Student's *t*-test or non-parametric tests when necessary. The actuarial survival analysis was performed by the Kaplan-Meier method and log-rank test. Overall survival was calculated according to standard definitions.²⁴

Results

EBV Latent Infection in Post-Transplant Lymphoproliferative Disorders: Histological, Molecular, and Genetics Subtypes

After review, 26 cases (74%) were classified as diffuse large B-cell lymphoma, 6 cases (17%) as polymorphic post-transplant lymphoproliferative disorders, 2 cases (6%) as classical Hodgkin lymphoma, and 1 (3%) as plasmacytoma-like lesion. None of the early lesions, neither infectious mononucleosis nor plasma cell hyperplasia, were identified probably due to the fact that those lesions are more frequently found in children, and our series lack pediatric cases with a median age of 54 years old.

EBV infection in tumor cells was observed in 28 patients (80%) assessed by strong nuclear expression of small EBV-encoded RNA genes, EBER 1 and 2. According to LMP-1 and EBNA-2 gene expression, the most common latency pattern was latency III observed in 13 patients (46%) followed by latency II in 9 (32%), and latency I in 6 (21%) (Figure 1).

All the polymorphic cases were EBV positive and 67% exhibit a latency III pattern of infection. In cases diagnosed as diffuse large B-cell lymphoma, EBV-infected tumor cells were observed in 19/26 cases (73%) with a latency III pattern in 47%. As expected, the two Hodgkin lymphoma cases were also EBV positive with a latency II. The plasmacy-

toma-like lesion was also EBV positive with a latency I pattern.

Clonality studies were available in 14 patients. Among diffuse large B-cell lymphoma cases, 7/10 showed a monoclonal IgH rearrangement and three of them were EBV positive, with latency III in 67%. Conversely, two of the four polymorphic cases studied were monoclonal and both were EBV positive with latency I and III, respectively.

Cytogenetic studies of *MYC*, *BCL-2*, and *BCL-6* were done in all cases. Genetic alterations were found in six cases, five of them EBV negative. *MYC* gains were observed in four EBV-negative diffusely large B-cell lymphomas and one EBV-positive polymorphic post-transplant lymphoproliferative disorder with latency I. This case was the only one with additional genetic alterations such as gains of *BCL-6* and *BCL-2*. An *MYC* rearrangement was observed only in one EBV-negative diffusely large B-cell lymphoma.

Only 13 cases, 12 following hematopoietic stem cell transplant and one following kidney transplant, were analyzed for donor vs host origin of tumor cells. All of them were of donor origin and all were also EBV+. Main cytogenetic features are listed in Table 2.

EBV Replication is Associated with Latency III and Monoclonal Diffusely Large B-cell Lymphoma

EBV replication was assessed by nuclear expression of the immediate-early BZLF1 and early BMRF1 lytic genes. A case was considered positive when more than two positive cells were seen in whole tumor section (Figure 2a). Although replication was mostly observed in large atypical tumor cells, scattered EBV replication-positive small lymphocytes were observed in three cases. EBV replication was detected in 17/28 tumors (60%) mainly with expression of both lytic genes. Only one case was negative for BZLF1 but positive for BMRF1. This case was considered to harbor intratumoral EBV replication. Western blot for BZLF1 was performed in five cases from available frozen material, three of them highly replicative and two with few positive cells by immunohistochemistry. The results of the western blot study are shown in Figure 2b.

According to intratumoral EBV replication, three groups were considered: the first one formed by patients who had EBV infection associated with EBV replication (EBV+/R+) (*n* = 17, 49%); the second, included patients with EBV infection without EBV replication (EBV+/R-) (*n* = 11, 31%); and the last

Figure 1 Left panel displays a diffuse large B-cell lymphoma with latency III Epstein-Barr virus (EBV) infection pattern. (a) Tumor is composed of large atypical cells with immunoblastic features and admixed plasma cells H&E ($\times 20$). The atypical cells express intense (b) CD20 ($\times 20$), and are infected by EBV (c) EBER ($\times 10$), with expression of (d) LMP-1 ($\times 20$) and (e) EBNA-2 ($\times 20$). Right panel shows a polymorphic post-transplant lymphoma with (f) prominent plasmacytic differentiation H&E ($\times 20$) with low (g) CD20 expression and a latency II EBV infection pattern with expression of (h) EBER ($\times 40$), (i) LMP-1 ($\times 40$) but (j) negativity for EBNA-2 ($\times 20$).

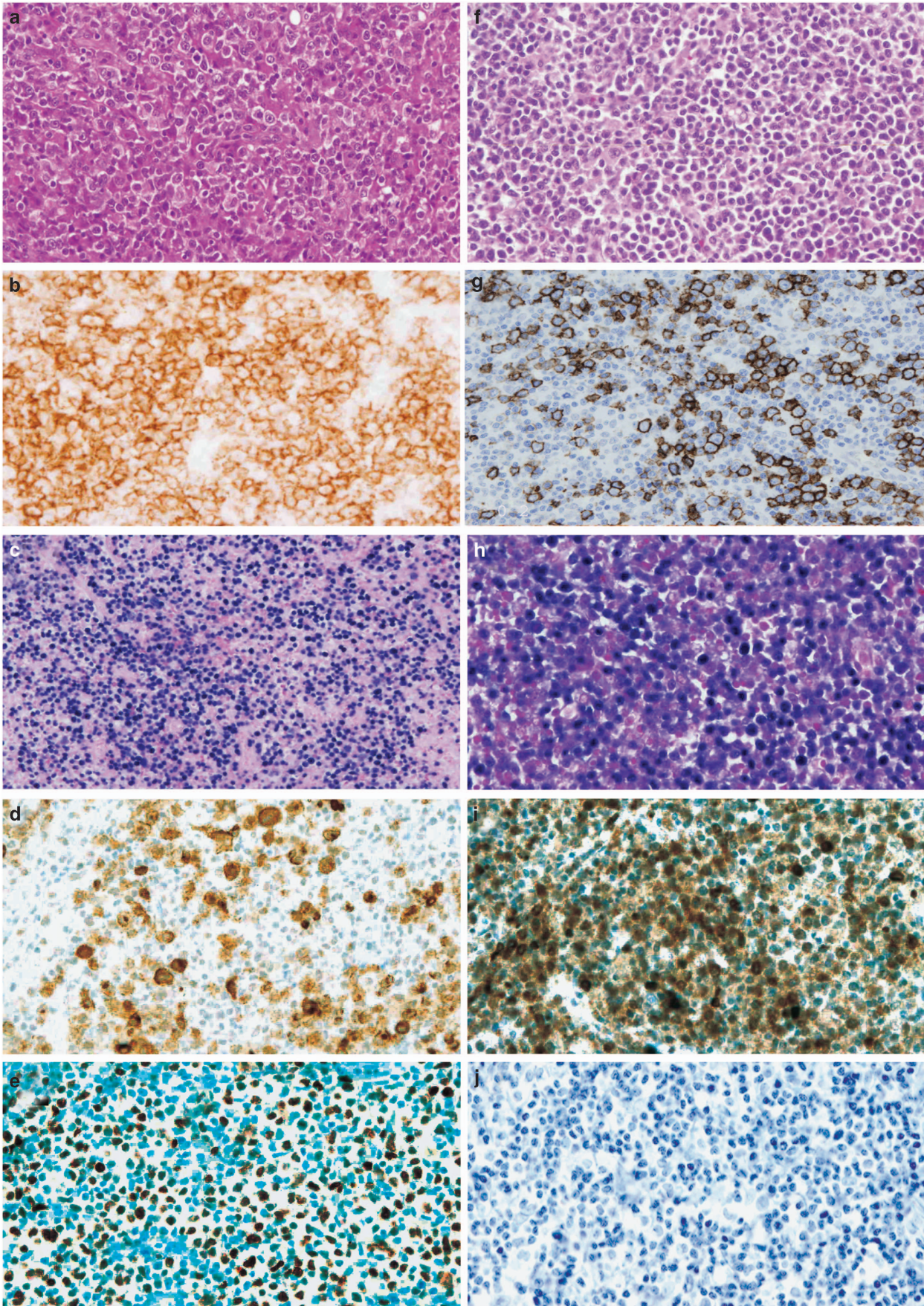


Table 2 Molecular and genetic features of 35 PTLD cases

Case	Diagnosis	Type of transplant	Host vs donor origin	Clonality	Genetics		
					CMYC	BCL-2	BCL-6
1	DLBCL	HSCT	Donor	ND	Normal	Normal	Normal
2	DLBCL	HSCT	Donor	ND	Normal	Normal	Normal
3	DLBCL	HSCT	Donor	Polyclonal	Normal	Normal	Normal
4	DLBCL	HSCT	Donor	ND	Normal	Normal	Normal
5	DLBCL	HSCT	Donor	ND	Normal	Normal	Normal
6	Polymorphic PTLD	HSCT	Donor	Clonal	Normal	Normal	Normal
7	Polymorphic PTLD	HSCT	Donor	Clonal	Gains	Gains	Gains
8	Polymorphic PTLD	HSCT	Donor	ND	NE	Normal	Normal
9	Polymorphic PTLD	HSCT	Donor	ND	Normal	Normal	Normal
10	Polymorphic PTLD	HSCT	Donor	Polyclonal	NE	NE	Normal
11	Hodgkin lymphoma	HSCT	Donor	ND	NE	NE	NE
12	Hodgkin lymphoma	HSCT	Donor	ND	NE	NE	NE
13	DLBCL	Liver	ND	Clonal	NE	NE	NE
14	DLBCL	Liver	ND	ND	Normal	Normal	Normal
15	DLBCL	Liver	ND	ND	NE	NE	NE
16	DLBCL	Liver	ND	Polyclonal	NE	NE	NE
17	DLBCL	Liver	ND	ND	Normal	Normal	Normal
18	DLBCL	Liver	ND	ND	Gain	NE	NE
19	Polymorphic PTLD	Liver	ND	Polyclonal	Normal	Normal	Normal
20	DLBCL	Kidney	ND	Clonal	Normal	Normal	Normal
21	DLBCL	Kidney	ND	Clonal	Normal	Normal	Normal
22	DLBCL	Kidney	ND	ND	NE	NE	NE
23	DLBCL	Kidney	ND	ND	Normal	Normal	Normal
24	DLBCL	Kidney	Donor	Clonal	NE	NE	NE
25	DLBCL	Kidney	ND	ND	NE	Normal	Normal
26	DLBCL	Kidney	ND	Polyclonal	NE	NE	NE
27	DLBCL	Kidney	ND	ND	ND	NE	NE
28	DLBCL	Kidney	ND	ND	Gains	Gains	Normal
29	DLBCL	Kidney	ND	ND	Gains	NE	NE
30	DLBCL	Kidney	ND	ND	NE	NE	NE
31	DLBCL	Heart	ND	Clonal	NE	NE	NE
32	DLBCL	Heart	ND	Clonal	Rearranged	Normal	Normal
33	DLBCL	Heart	ND	Clonal	Gains	Normal	Normal
34	DLBCL	Heart	ND	ND	Normal	Normal	Normal
35	Plasmacytoma-like lesion	Heart	ND	ND	NE	Normal	Normal

Abbreviations: DLBCL, diffuse large B-cell lymphoma; HSCT, hematopoietic stem cell transplantation; ND, not-done; NE, not evaluable; PTLD, Post-transplant lymphoproliferative disorder.

with EBV-negative patients (EBV $-$) ($n = 7$, 20%). Main clinicopathological features of these patients according to EBV replication status are listed in Table 3.

The EBV $+/R+$ group encompasses 12 diffuse large B-cell lymphoma cases and five polymorphic ones. Neither the Hodgkin lymphoma cases nor the plasmacytoma were associated with intratumoral EBV replication. Latency III infection pattern was more frequently observed in patients with active replication (11/17, 65% vs 2/11, 18% for EBV $+/R+$ and EBV $+/R-$ cases, respectively, $P = 0.017$). Interestingly, all 13 cases proved to be of donor origin were EBV positive, 8 with replication.

EBV Replication is Related to XBP1 Activation and Plasma Cell Differentiation

As plasma cell differentiation and EBV replication converges in XBP1 activation, we then analyzed

XBP1 expression by immunohistochemistry. Among diffuse large B-cell lymphoma cases, nuclear XBP1 expression was found in 9 of 32 cases studied. Positivity was observed quite homogeneously among tumor cells. In some cases, cytoplasmic expression was also seen. Strong nuclear expression was observed in plasma cells as well as in the small and large lymphocytes with variable degrees of plasma cell differentiation in all five polymorphic cases studied. None of the Hodgkin cases had nuclear XBP1 expression. All of them were EBV positive without intratumoral viral replication. Interestingly, the only case of plasmacytoma-like lesion was strongly positive for XBP1, probably related to a full secretory transformation of tumor cells. This case was EBV positive with latency I without intratumoral replication.

Remarkably, among EBV-positive cases, a strong correlation was found between viral replication and nuclear XBP1 expression (11/12 $R+$ vs 4/11 $R-$; $P = 0.005$) (Figure 2c).

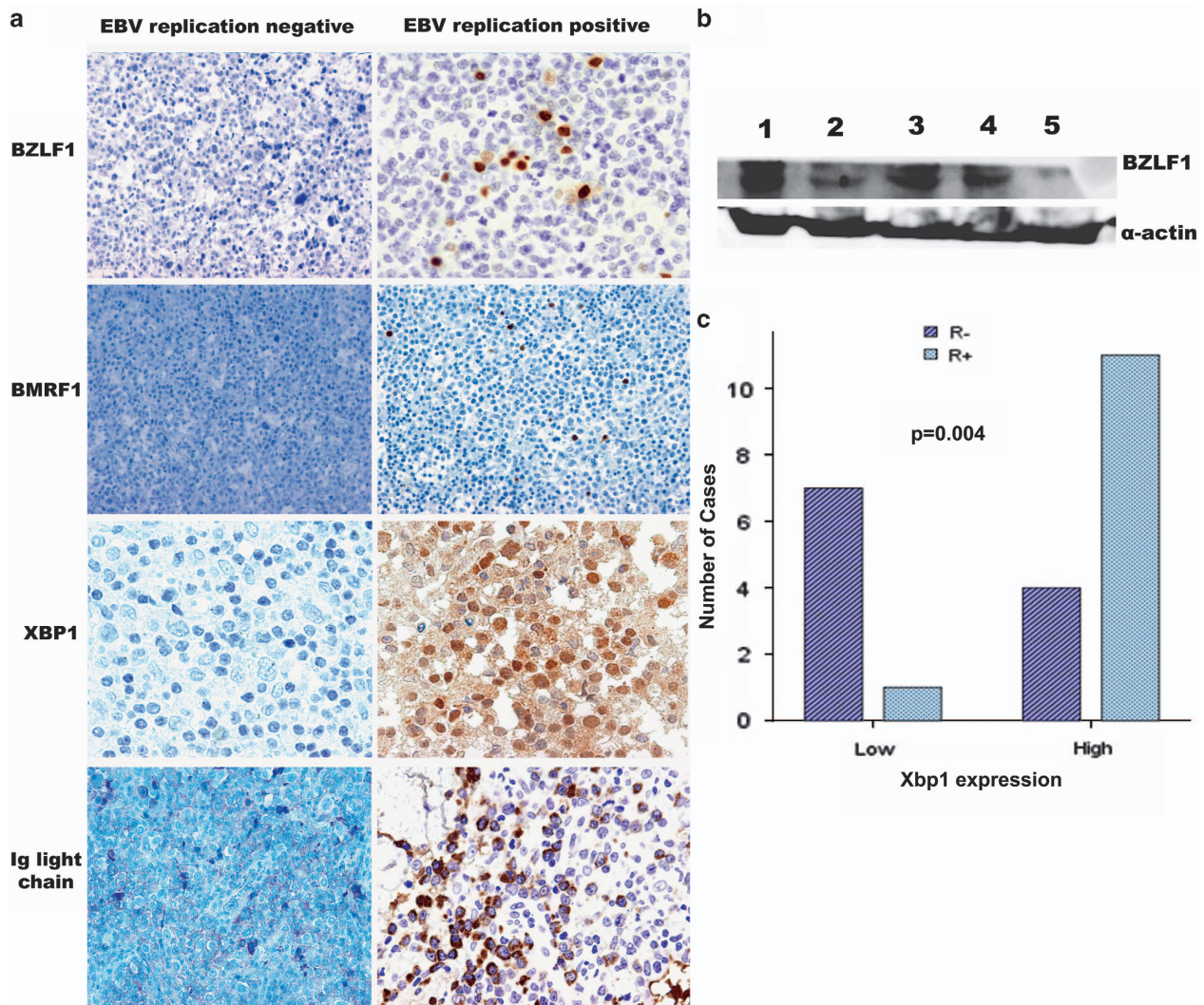


Figure 2 (a) Intratumoral Epstein-Barr virus (EBV) replication and XBP1 expression. Left panel shows a case of diffuse large B-cell lymphoma without EBV replication, negative for BZLF1 ($\times 20$) and BMRF1 ($\times 20$) and negativity for XBP1 ($\times 40$) and without light chain expression. Right panel, depicts a polymorphic post-transplant lymphoma with high EBV replication, positive for BZLF1 ($\times 20$) and BMRF1 ($\times 20$) with high nuclear XBP1 expression ($\times 40$) and strong cytoplasmic light chain expression. (b) Western Blot for BZLF1. Cases 1, 3, and 4 correspond to highly replicative tumors; cases 2 and 5 correspond to low replication samples. (c) EBV replication is significantly higher in XBP1-positive cases ($P=0.004$).

EBV Replication is Associated with Early Post-Transplant Lymphoproliferative Disorder

Twenty-three patients (66%) received solid organ transplantation, including kidney in 11 cases. Most patients (97%) were receiving immunosuppressive therapy at the time of diagnosis. The median interval between transplant and the onset of the lymphoma was 26 months (range 2–252 months). The lapsed time between transplant and the diagnosis was 5 months in hematopoietic stem cell transplantation recipients and 61 months following solid organ transplantation ($P=0.0004$). Twelve patients (34%) were diagnosed with early-onset post-transplant lymphoproliferative disorder (<1 year

after transplant) and 23 (66%) with late onset. Early-onset cases were more frequently observed in hematopoietic stem cell transplantation recipients (9/12 vs 3/23 for hematopoietic and solid organ, respectively; $P=0.0005$). No significant correlation was found between the time from transplant and EBV serology status, organ rejection or graft vs host disease presence. Reactivation of cytomegalovirus infection was observed in 12 patients (39%), and it was more frequent in patients with an early than late post-transplant lymphomas (7/12 vs 4/20; $P=0.04$). Polymorphic cases showed more frequently an early-onset than the other histological subgroups (5/6 vs 7/29; $P=0.0118$) whereas in the late-onset group, the most frequent subtype found were the

Table 3 Main clinicobiological characteristics according to EBV status

	EBV–	EBV+/R–	EBV+/R+
Age, years (median, range)	58 (41–77)	50 (30–74)	56 (26–75)
Gender (male/female)	4/3	8/3	14/3
SOT/HSCT	7/0	8/3	9/8
Rejection or GVHD	5/6 (83%)	7/10 (70%)	9/16 (56%)
CMV reactivation	1/6 (17%)	2/10 (20%)	9/16 (56%)
<i>Time transplant to PTLD*</i>			
Median, range (months)	139 (46–252)	44 (4–206)	7 (2–119)
< 1 year (early-onset PTLD)	0	2 (18%)	10 (59%)
> 1 year (late-onset PTLD)	7 (100%)	9 (81%)	7 (41%)
<i>Histological subtype</i>			
Monomorphic PTLD			
DLBCL	7	7	12
Plasmacytoma-like PTLD	0	1	0
Polymorphic PTLD	0*	1	5
Hodgkin lymphoma-type PTLD	0	1	0
EBV latency pattern I/II/III*			
Advanced stage at diagnosis	2/7 (26%)	5/11 (45%)	7/17 (41%)
Complete response	4/7 (57%)	4/10 (40%)	5/15 (33%)
OS (from PTLD) at 1 year (%)	57	45	25

Abbreviations: CMV, cytomegalovirus; DLBCL, diffuse large B-cell lymphoma; EBV, Epstein–Barr virus; GVHD, graft vs host disease; HSCT, hematopoietic stem cell transplantation; OS, overall survival; PTLD, post-transplant lymphoproliferative disorder; R, viral replication; SOT, solid organ transplantation.

* $P < 0.05$.

monomorphic (20/23 vs 7/12; $P = 0.0331$). Patients with EBV+/R+ lymphomas had more frequently an early-onset of the disease (10/17 vs 2/18; $P = 0.09$). The median time from transplant was significantly shorter in this group of patients (7 months) than in EBV+/R– (45 months) and EBV– (140 months) ($P < 0.001$).

According to the site of involvement, 9 cases were nodal and 26 were extranodal, including gastrointestinal tract ($n = 5$), liver ($n = 4$), and central nervous system (CNS) ($n = 5$). All cases with CNS involvement were EBV positive. The main features of the cases at diagnosis are detailed in Table 1. Thirteen patients (40%) had disseminated disease, including bone marrow and CNS involvement in six and two patients, respectively.

EBV PCR was positive in peripheral blood in seven patients and in cerebrospinal fluid in six at the moment of the diagnosis. In 77% of these cases, intratumoral EBV replication was observed in the biopsy. In three cases, PCR was negative at the onset of an EBV-positive lymphoma. Two of them did not exhibit intratumoral EBV replication.

Curiously, cytomegalovirus reactivation was more frequently observed in the group of patients who developed a latency III EBV-positive lymphomas with intratumoral replication (7/11 vs 5/21, $P = 0.003$). This group of patients tend to have a lower incidence of graft vs host disease or solid organ rejection (7/11 vs 14/21, $P = 0.0582$).

Aggressive Post-Transplant Lymphoproliferative Disorders are Associated with the Combination of Latency III, Viral Replication, and XBP1 Activation

The front-line treatment slightly varied over the time and often combined different modalities, but could be summarized as follows: decreased immunosuppressive therapy (90%), rituximab (71%), adriamycin-containing chemotherapy (45%). Eleven patients were treated with others regimens, including radiotherapy, surgery, lymphocytes infusion, and intrathecal methotrexate. No difference was found according to the time of lymphoma onset. Three patients were not treated. Thirteen patients (41%) achieved complete response and four (12%) obtained a partial response whereas 15 patients (47%) were considered non-responders including three early deaths. One of the 13 patients with complete response eventually relapsed at 14 months.

After a median follow-up for surviving patients of 74 months, 26 patients have died with a 1-year overall survival of 38% (95% CI: 22–54.9). One year overall survivals between early and late-onset post-transplant cases were 37% and 39%, respectively. The causes of death were disease progression ($n = 19$), infection ($n = 3$), organ rejection ($n = 3$), and second neoplasia ($n = 1$). Overall survival according EBV infection and replication are showing a 1-year overall survival of 25%, 45%, and 57% for EBV+/R+, EBV+/R–, and EBV– patients, respectively ($P = \text{NS}$) (Figure 3). Interestingly, the

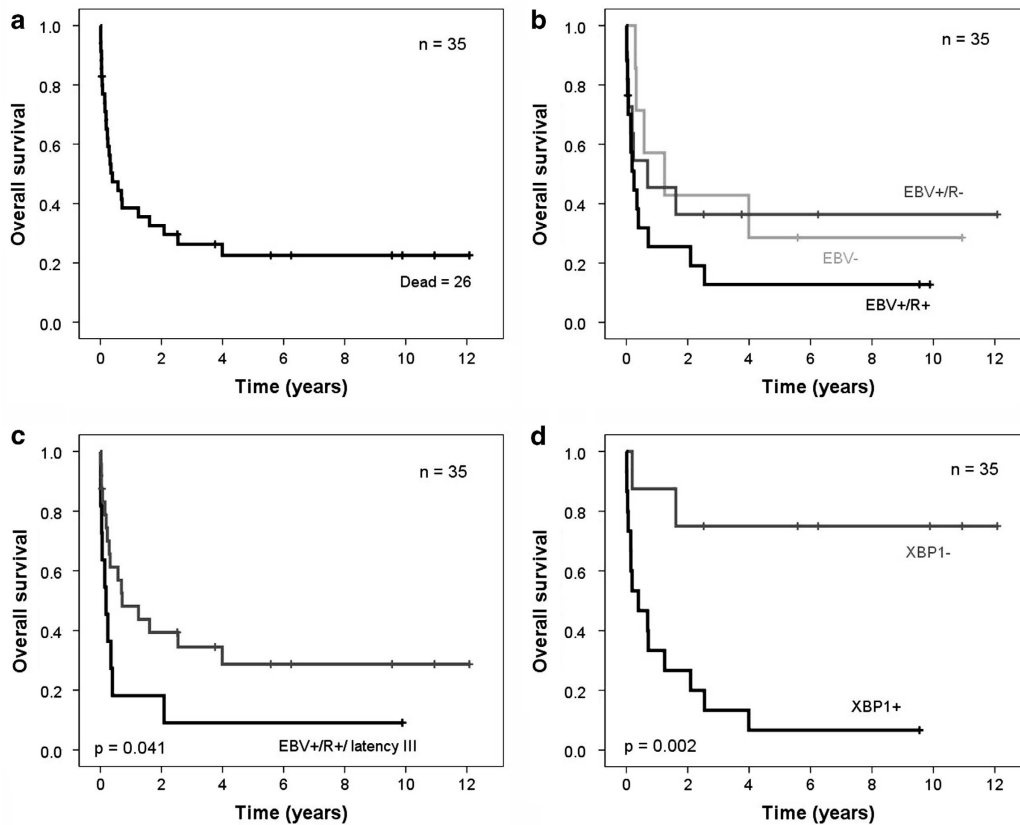


Figure 3 (a) Overall survival of all patients with post-transplant lymphoproliferative disorders. Overall survival according to (b) EBV replication, (c) coexpression of the highly immunogenic program latency III and active viral replication and (d) XBP1 activation.

group with latency III infection pattern and intratumoral EBV replication showed significant shorter survival (18% vs 48%, $P=0.041$) (Figure 3).

Nuclear XBP1 expression was also associated with aggressive behavior with a 1-year overall survival of 33% for the XBP1-positive cases vs 87% for the negative ones ($P=0.002$).

Discussion

We reported a series of post-transplant lymphoproliferative disorders with extensive EBV investigation which, for the first time, addresses the role of intratumoral viral replication in tissues. EBV has a major role in the development of post-transplant lymphomas, as infected tumor cells are present in the majority of cases.⁶ Primary EBV infection often precedes the onset of pediatric cases and EBV seronegativity at the time of transplantation is a major risk factor for the development of post-transplant lymphomas.^{25,26} Moreover, prophylactic antiviral therapies are effective in preventing post-transplant lymphomas, particularly in children, highlighting the role of primary EBV infection or EBV reactivation in their development.^{19,20,27}

During primary EBV infection and EBV reactivation, active viral replication occurs.²⁸ Viral replication is

the hallmark of the lytic phase and EBV replication has an important role in lymphomagenesis.^{14,29} Humanized mice infected with lytically active viral strains (BZLF1+) develop more lymphomas than animals infected with replication-defective strains (BZLF1-).¹⁴ Intratumoral replication can be demonstrated by nuclear expression of the lytic genes in tumor cells in tissue sections. Here we showed for the first time intratumoral replication in primary samples of human post-transplant lymphoma cases. We analyzed the expression of two main genes involved in the initiation of the lytic EBV phase: BZLF1 and BMRF1. Lytic gene products are expressed in three consecutive stages: immediate-early, early, and late. Immediate-early lytic gene products act as transactivators, enhancing the expression of later lytic genes. Early products have a wide array of functions, including replication, metabolism, and blockade of antigen processing, while late products tend to code for structural proteins such as viral capsid antigens and gene products used for immune evasion. Immediate-early BZLF1/ZEBRA and early BMRF1/EADE31 lytic genes are expressed in 60% of the EBV-associated lymphoma cases in our series. Interestingly, EBV replication seems to occur mostly in a small fraction of the atypical neoplastic cells, although it is difficult to exclude replication in non-neoplastic

intratumoral cells. This phenomenon is also observed in mice, where although the number of lytically infected cells is low, it is important for the development of lymphoma. The low number of viable lytically infected cells is probably related to the fact that lytic EBV infection may become cytotoxic in some cells and may sensitize host cells to NK-cell mediated killing.^{30–32} In spite of the origin of viral particles, either from neoplastic or non-neoplastic cells, the presence of viral particles generates a microenvironment that may promote tumor growth as proposed in other EBV-related disorders. The expression of some lytic genes, such as, BZLF1/ZEBRA induces the secretion of IL10 by B cells promoting B cell survival of both neoplastic and non-neoplastic populations. Moreover, host-infected cells may undergo lysis and allow horizontal spread of EBV from cell to cell increasing the pool of latently infected B cells with active oncogenic viral genes.¹⁴ Viral replication in tumor cell may be more relevant to tumor biology. In this sense, two lytic genes BHRF1 and BALF1 are viral Bcl-2 homologs that may promote tumor survival.^{33,34}

Plasma cell differentiation initiates viral replication of EBV. XBP1 is a transcription factor that positively regulates the expression of the immediate-early gene BZLF1.^{15,35} XBP1 is involved in normal plasma cell differentiation and is expressed in tumors with plasma cell differentiation.¹⁷ In addition, important B-cell transcription factors repressing plasma cell differentiation have been shown to repress also EBV replication.^{36,37} Curiously most of post-transplant lymphoproliferative disorders exhibit plasma cell differentiation suggesting a connection between these two events in transplant recipients. It is of interest that, as in other aggressive lymphomas, XBP1 activation is related to aggressive disease.¹⁷

Latency is the state of persistent EBV viral infection without active viral production. In contrast to lytic replication, there is a limited expression of EBNAs and LMP gene products during latency.¹¹ Latency III program, in which all of the latency gene products are expressed, is often detected during acute infectious mononucleosis or in certain immunocompromised individuals.^{11,38,39} This latency program, also known as growth program, while highly characteristic of immunosuppressed individuals, is only observed in 46% of our EBV-positive cases. This may be explained in part by the tendency to moderate the immunosuppressant regimens in these patients⁴⁰ and to the repression of EBNAs during plasma cell differentiation of latency III infected B cells.^{5,16,41}

Latency programs can be disrupted by a variety of cellular activators, resulting in the expression of lytic proteins capable to switch from latency to lytic cycle. Activation of lytic replication or reactivation from latency is the key to the transmission of EBV-infected B cells that are induced to activate their growth program and differentiate into memory B cells via the germinal center reaction. Infected

memory B cells are then released into the peripheral blood resulting in detectable levels of virus in the serum. Thus, some authors have used serum PCR to evaluate EBV replication.^{3,42} In our series, a low correlation is observed between PCR in blood and replication analysis in involved organs, similarly to what is observed in other virus that replicates in tissues.^{43,44} In the latent stage, EBV DNA exists as a closed circular episome, replicates once, and only once during S phase, and is equally distributed into daughter cells.⁴⁵ In contrast to lytic replication, episomal replication during the latent phase occurs via host DNA polymerase, therefore insensitive to the standard antiviral therapies that targets only viral DNA polymerase. Thus, the assessment of replicative stage of EBV should be performed before deciding any antiviral therapeutic approach in patients with post-transplant lymphomas.^{46–48}

The use of antiviral as prophylactic treatment to prevent post-transplant lymphoma development has been proved to be effective in pediatric cases.¹⁹ However, in adults, the results are controversial, probably because most of the adults are already infected at the time of transplant and there is not a standardized protocol to study donor and recipient EBV status before transplant.^{20,49,50}

The gold standard for post-transplant lymphoproliferative disorder treatment is reduction of immunosuppression with encouraging results in early lesions and some polymorphic cases, whereas it is more controversial in monomorphic ones. It is important to enhance that reducing immunosuppression for treating these subset of lymphomas early after hematopoietic stem cell transplantation is usually not useful. These deeply immunosuppressed patients need more time to recover the immune system and also to eradicate malignant cells, although reducing immunosuppression alone have been occasionally successful in the management of patients following hematopoietic stem cell transplantation.

Current treatment guidelines recommend reduction of immunosuppression at diagnosis and some authors suggest sequential treatment with rituximab and CHOP chemotherapy regimen (cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone) in non-responding patients as first-line treatment when reduction of immunosuppression is not effective.⁴ Nevertheless, the strength of reduction of immunosuppression is variable and tends to be more severe in patients requiring immunochemotherapy.^{4,9} Intriguingly, rituximab and steroids, which are included in the standard treatment regimen of these patients, are known to be potent inducers of EBV replication *in vitro*.⁴⁶ Moreover, chemotherapy is also shown to reactivate lytic infection rendering tumor cells sensitive to antiviral agents.⁵¹ EBV-specific cytotoxic T-cell therapy has been proven to be useful for the management of EBV post-transplant lymphoma cases even in rituximab-resistant ones, but unfortunately is not widely available.⁵²

The proteasome inhibitor bortezomib, that interferes with XBP1 activation in plasma cell tumors also induces lytic virus replication in EBV-infected cells and is currently being evaluated in clinic trials of gamma-herpes virus-associated malignancies including post-transplant lymphomas.^{53–55}

In our patients, the simultaneous expression of a latency III pattern associated with intratumoral EBV replication seems to detect a subset of heavily immunosuppressed group of patients with lower rates of rejections or graft vs host disease and higher rates of cytomegalovirus reactivations. These patients have significantly lower overall survival rates and shorter time to develop lymphomas. Although it is possible that this poor outcome was due basically to the particular immunodeficiency of those patients, our data suggest that EBV intratumoral replication has an important role in the aggressive behavior of the tumor. Moreover, the combination of important reduction of immunosuppression with specific targeting of viral replication (antiviral drugs) might eliminate the lytically infected tumor cells and prevent the spreading of EBV and its oncogenic genes to uninfected cells.

Acknowledgments

AM is supported by Fondo de Investigación Sanitaria and ERDF *One way to Europe* PI11/00907 and by Instituto de Salud Carlos III. AM, GR, CS, and DC are funded by 'Red Temática de Investigación Cooperativa de Cáncer' (RTICC) RD12/0036/0004. DM is supported by Instituto de Salud Carlos III, "Contratos de Formación en Investigación Río Hortega" CM12/00054. AL-G is supported by SAF 08/SAF 2008-03630 and Instituto de Salud Carlos III, 'Red Temática de Investigación Cooperativa de Cáncer' (RTICC) RD12/0036/0023. EC is supported by Red Temática de Investigación Cooperativa en Cáncer (RTICC) RD12/0036/0036 and SAF12/38432.

Disclosure/conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- 1 Swerdlow SH, Webber SA, Chadburn A, *et al*. Post-transplant lymphoproliferative disorders. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, *et al*. (eds). WHO Classification of Tumors of Hematopoietic and Lymphoid Tissues, 4th edn. IARC Press: Lyon, France; 2008, pp 465–469.
- 2 Dierickx D, Tousseyn T, Sagaert X, *et al*. Single-center analysis of biopsy-confirmed posttransplant lymphoproliferative disorder: incidence, clinicopathological characteristics and prognostic factors. *Leuk Lymphoma*. 2013;54:2433–2440.
- 3 Kroll J, Li S, Levi M, *et al*. Lytic and latent EBV gene expression in transplant recipients with and without post-transplant lymphoproliferative disorder. *J Clin Virol*. 2011;52:231–235.
- 4 Trappe R, Oertel S, Leblond V, *et al*. Sequential treatment with rituximab followed by CHOP chemotherapy in adult B-cell post-transplant lymphoproliferative disorder (PTLD): the prospective international multicentre phase 2 PTLT-1 trial. *Lancet Oncol*. 2012;13:196–206.
- 5 Rasul AE, Nagy N, Sohlberg E, *et al*. Simultaneous detection of the two main proliferation driving EBV encoded proteins, EBNA-2 and LMP-1 in single B cells. *J Immunol Methods*. 2012;385:60–70.
- 6 Leblond V, Davi F, Charlotte F, *et al*. Posttransplant lymphoproliferative disorders not associated with Epstein-Barr virus: a distinct entity? *J Clin Oncol*. 1998;16:2052–2059.
- 7 Ferry JA, Jacobson JO, Conti D, *et al*. Lymphoproliferative disorders and hematologic malignancies following organ transplantation. *Mod Pathol*. 1989;2:583–592.
- 8 Dolcetti R. B lymphocytes and Epstein-Barr virus: the lesson of post-transplant lymphoproliferative disorders. *Autoimmun Rev*. 2007;7:96–101.
- 9 Evens AM, David KA, Helenowski I, *et al*. Multicenter analysis of 80 solid organ transplantation recipients with post-transplantation lymphoproliferative disease: outcomes and prognostic factors in the modern era. *J Clin Oncol*. 2010;28:1038–1046.
- 10 Evens AM, Choquet S, Kroll-Desrosiers AR, *et al*. Primary CNS Posttransplant Lymphoproliferative Disease (PTLD): An International Report of 84 Cases in the Modern Era. *Am J Transplant*. 2013;13:1512–1522.
- 11 Siok-Bian N, Lee V, Das K, *et al*. The relevance of molecular diagnostics in the practice of surgical pathology. *Expert Opin Med Diagn* 2008;2:1401–1414.
- 12 Straus SE, Cohen JL, Tosato G, *et al*. NIH conference. Epstein-Barr virus infections: biology, pathogenesis, and management. *Ann Intern Med* 1993;118:45–58.
- 13 Harris NL, Ferry JA, Swerdlow SH. Posttransplant lymphoproliferative disorders: summary of Society for Hematopathology Workshop. *Semin Diagn Pathol*. 1997;14:8–14.
- 14 Ma SD, Hegde S, Young KH, *et al*. A new model of Epstein-Barr virus infection reveals an important role for early lytic viral protein expression in the development of lymphomas. *J Virol*. 2011;85:165–177.
- 15 Bhende PM, Dickerson SJ, Sun X, *et al*. X-box-binding protein 1 activates lytic Epstein-Barr virus gene expression in combination with protein kinase D. *J Virol*. 2007;81:7363–7370.
- 16 Taylor GM, Raghuvanshi SK, Rowe DT, *et al*. Endoplasmic reticulum stress causes EBV lytic replication. *Blood* 2011;118:5528–5539.
- 17 Balague O, Mozos A, Martinez D, *et al*. Activation of the endoplasmic reticulum stress-associated transcription factor x box-binding protein-1 occurs in a subset of normal germinal-center B cells and in aggressive B-cell lymphomas with prognostic implications. *Am J Pathol*. 2009;174:2337–2346.
- 18 Pathel SH, Anagnostopoulos I, Hummel MW, *et al*. Identification of early antigen BZLF1/ZEBRA protein of Epstein-Barr virus can predict the effectiveness of antiviral treatment in patients with post-transplant lymphoproliferative disease. *Br J Haematol*. 2002;118:1120–1123.
- 19 Hocker B, Bohm S, Fickenscher H, *et al*. (Val-) Ganciclovir prophylaxis reduces Epstein-Barr virus primary infection in pediatric renal transplantation. *Transpl Int*. 2012;25:723–731.

- 20 Funch DP, Walker AM, Schneider G, *et al*. Ganciclovir and acyclovir reduce the risk of post-transplant lymphoproliferative disorder in renal transplant recipients. *Am J Transplant*. 2005;5:2894–2900.
- 21 Garcia-Herrera A, Song JY, Chuang SS, *et al*. Non-hepatosplenic gammadelta T-cell lymphomas represent a spectrum of aggressive cytotoxic T-cell lymphomas with a mainly extranodal presentation. *Am J Surg Pathol*. 2011;35:1214–1225.
- 22 Valera A, Balague O, Colomo L, *et al*. IG/MYC rearrangements are the main cytogenetic alteration in plasmablastic lymphomas. *Am J Surg Pathol*. 2010;34:1686–1694.
- 23 van Dongen JJ, Langerak AW, Bruggemann M, *et al*. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia* 2003;17:2257–2317.
- 24 Cheson BD, Pfistner B, Juweid ME, *et al*. Revised response criteria for malignant lymphoma. *J Clin Oncol*. 2007;25:579–586.
- 25 Caillard S, Lelong C, Pessione F, *et al*. Post-transplant lymphoproliferative disorders occurring after renal transplantation in adults: report of 230 cases from the French Registry. *Am J Transplant*. 2006;6:2735–2742.
- 26 Webber SA. Post-transplant lymphoproliferative disorders: a preventable complication of solid organ transplantation? *Pediatr Transplant*. 1999;3:95–99.
- 27 Chinnock R, Webber SA, Dipchand AI, *et al*. A 16-year multi-institutional study of the role of age and EBV status on PTLTD incidence among pediatric heart transplant recipients. *Am J Transplant*. 2012;12:3061–3068.
- 28 Young LS. Epstein-Barr-virus infection and persistence: a B-cell marriage in sickness and in health. *Lancet* 1999;354:1141–1142.
- 29 Hong GK, Gulley ML, Feng WH, *et al*. Epstein-Barr virus lytic infection contributes to lymphoproliferative disease in a SCID mouse model. *J Virol*. 2005;79:13993–14003.
- 30 Blazar B, Patarroyo M, Klein E, *et al*. Increased sensitivity of human lymphoid lines to natural killer cells after induction of the Epstein-Barr viral cycle by superinfection or sodium butyrate. *J Exp Med*. 1980;151:614–627.
- 31 Sairenji T, Katsuki T, Hinuma Y. Cell-killing by Epstein-Barr virus: analysis by colony inhibition procedure. *Int J Cancer*. 1976;17:389–395.
- 32 Pappworth IY, Wang EC, Rowe M. The switch from latent to productive infection in Epstein-Barr virus-infected B cells is associated with sensitization to NK cell killing. *J Virol*. 2007;81:474–482.
- 33 Altmann M, Hammerschmidt W. Epstein-Barr virus provides a new paradigm: a requirement for the immediate inhibition of apoptosis. *PLoS Biol*. 2005;3:e404.
- 34 Marshall WL, Yim C, Gustafson E, *et al*. Epstein-Barr virus encodes a novel homolog of the bcl-2 oncogene that inhibits apoptosis and associates with Bax and Bak. *J Virol*. 1999;73:5181–5185.
- 35 McDonald C, Karstegl CE, Kellam P, *et al*. Regulation of the Epstein-Barr virus Zp promoter in B lymphocytes during reactivation from latency. *J Gen Virol*. 2010;91:622–629.
- 36 Raver RM, Panfil AR, Hagemeyer SR, *et al*. The B-Cell specific transcription factor and master regulator, Pax5, promotes EBV latency by negatively regulating the viral immediate early protein, BZLF1. *J Virol*. 2013;87:8053–8063.
- 37 Robinson AR, Kwek SS, Kenney SC. The B-cell specific transcription factor, Oct-2, promotes Epstein-Barr virus latency by inhibiting the viral immediate-early protein, BZLF1. *PLoS Pathog*. 2012;8:e1002516.
- 38 Roschewski M, Wilson WH. EBV-associated lymphomas in adults. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2012;25:75–89.
- 39 Young LS, Rickinson AB. Epstein-Barr virus: 40 years on. *Nat Rev Cancer*. 2004;4:757–768.
- 40 Srinivas TR, Meier-Kriesche HU. Minimizing immunosuppression, an alternative approach to reducing side effects: objectives and interim result. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2008;3(Suppl 2):S101–S116.
- 41 Nagy N, Adori M, Rasul A, *et al*. Soluble factors produced by activated CD4+ T cells modulate EBV latency. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012;109:1512–1517.
- 42 Vajro P, Lucariello S, Migliaro F, *et al*. Predictive value of Epstein-Barr virus genome copy number and BZLF1 expression in blood lymphocytes of transplant recipients at risk for lymphoproliferative disease. *J Infect Dis*. 2000;181:2050–2054.
- 43 Mozos A, Garrido M, Carreras J, *et al*. Redistribution of FOXP3-positive regulatory T cells from lymphoid tissues to peripheral blood in HIV-infected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2007;46:529–537.
- 44 Gotoh K, Ito Y, Maruo S, *et al*. Replication of Epstein-Barr virus primary infection in human tonsil tissue explants. *PLoS One* 2011;6:e25490.
- 45 Tsurumi T, Fujita M, Kudoh A. Latent and lytic Epstein-Barr virus replication strategies. *Rev Med Virol*. 2005;15:3–15.
- 46 Daibata M, Bandobashi K, Kuroda M, *et al*. Induction of lytic Epstein-Barr virus (EBV) infection by synergistic action of rituximab and dexamethasone renders EBV-positive lymphoma cells more susceptible to ganciclovir cytotoxicity *in vitro* and *in vivo*. *J Virol*. 2005;79:5875–5879.
- 47 Meng Q, Hagemeyer SR, Fingerroth JD, *et al*. The Epstein-Barr virus (EBV)-encoded protein kinase, EBV-PK, but not the thymidine kinase (EBV-TK), is required for ganciclovir and acyclovir inhibition of lytic viral production. *J Virol*. 2010;84:4534–4542.
- 48 Odumade OA, Hogquist KA, Balfour HH Jr. Progress and problems in understanding and managing primary Epstein-Barr virus infections. *Clin Microbiol Rev*. 2011;24:193–209.
- 49 Aris RM, Maia DM, Neuringer IP, *et al*. Post-transplantation lymphoproliferative disorder in the Epstein-Barr virus-naïve lung transplant recipient. *Am J Respir Crit Care Med*. 1996;154:1712–1717.
- 50 Kuo PC, Dafoe DC, Alfrey EJ, *et al*. Posttransplant lymphoproliferative disorders and Epstein-Barr virus prophylaxis. *Transplantation* 1995;59:135–138.
- 51 Feng WH, Israel B, Raab-Traub N, *et al*. Chemotherapy induces lytic EBV replication and confers ganciclovir susceptibility to EBV-positive epithelial cell tumors. *Cancer Res*. 2002;62:1920–1926.
- 52 Doubrovina E, Oflaz-Sozmen B, Prockop SE, *et al*. Adoptive immunotherapy with unselected or EBV-specific T cells for biopsy-proven EBV+ lymphomas

- after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood* 2012;119:2644–2656.
- 53 Mozos A, Roue G, Lopez-Guillermo A, *et al*. The expression of the endoplasmic reticulum stress sensor BiP/GRP78 predicts response to chemotherapy and determines the efficacy of proteasome inhibitors in diffuse large b-cell lymphoma. *Am J Pathol.* 2011;179:2601–2610.
- 54 Ling SC, Lau EK, Al-Shabeeb A, *et al*. Response of myeloma to the proteasome inhibitor bortezomib is correlated with the unfolded protein response regulator XBP-1. *Haematologica* 2012;97:64–72.
- 55 Reid EG. Bortezomib-induced Epstein-Barr virus and Kaposi sarcoma herpes virus lytic gene expression: oncolytic strategies. *Curr Opin Oncol.* 2011;23:482–487.

Segundo trabajo

HHV8-related lymphoid proliferations: a broad spectrum of lesions from reactive lymphoid hyperplasia to overt lymphoma

Blanca Gonzalez-Farre, Daniel Martinez, Monica Lopez-Guerra, Marc Xipell, Ester Monclus, Jordina Rovira, Felipe Garcia, Armando Lopez-Guillermo, Luis Colomo, Elias Campo and Antonio Martinez

Resumen

Las proliferaciones linfoides asociadas a HHV8 son lesiones poco frecuentes, que están poco caracterizadas y que se desarrollan principalmente en pacientes inmunodeprimidos, especialmente en el contexto de infección por HIV. Representan un espectro de lesiones con hallazgos clínicos y morfológicos superponibles que dificultan su clasificación. Además, el papel de HHV8 en las hiperplasias linfoides reactivas no se conoce bien en pacientes inmunodeprimidos.

Para analizar el espectro clínico-patológico de estas lesiones, en este trabajo revisamos 66 biopsias de 61 pacientes con infección por HHV8. En todos los casos se analizó también la seropositividad para HIV y la presencia del EBV mediante hibridación *in situ*.

Identificamos 13 (20%) casos de hiperplasia linfoide reactiva asociada a HHV8, 2 (3%) casos de proliferaciones plasmablasticas de la pulpa roja esplénica, 28 (42%) casos de MCD, 6 (9%) casos de GLPD y 17 (26%) casos de linfomas asociados a HHV8. Como esperábamos, detectamos una correlación entre el subtipo histológico y la supervivencia global ($p < 0.05$).

Cuarenta y siete casos se desarrollaban en el contexto de infección por HIV (77%). Además de la presentación y la morfología ya reconocida de las distintas entidades, identificamos también nuevos hallazgos. Las hiperplasias linfoides asociadas

a HHV8 frecuentemente se presentaron con síntomas sistémicos pero no progresaron a linfomas. Dos casos presentaban proliferaciones linfoides limitadas al bazo. Ocho casos de MCD debutaron de forma atípica poco después del diagnóstico de HIV, seis casos se presentaron con derrames y en tres casos existía una proliferación celular enriquecida en plasmablastos. Uno de los GLPD era EBV negativo y 3 se desarrollaban en pacientes HIV positivos y tenían hallazgos clínicos y patológicos particulares. Dos de los linfomas asociados a HHV8 no cumplían criterios de ninguna de las entidades conocidas.

Los hallazgos de este estudio expanden el espectro clínico y patológico de las proliferaciones linfoides asociadas a HHV8 con lesiones y características no reconocidas previamente.

HHV8-related lymphoid proliferations: a broad spectrum of lesions from reactive lymphoid hyperplasia to overt lymphoma

Blanca Gonzalez-Farre¹, Daniel Martinez¹, Monica Lopez-Guerra¹, Marc Xipell², Ester Monclus², Jordina Rovira³, Felipe Garcia⁴, Armando Lopez-Guillermo³, Luis Colomo⁵, Elias Campo¹ and Antonio Martinez¹

¹Department of Pathology, Hospital Clinic, Institut d'Investigacions Biomediques August Pi I Sunyer (IDIBAPS), University of Barcelona, Barcelona, Spain; ²Department of Geriatrics, Hospital Clinic, University of Barcelona, Barcelona, Spain; ³Department of Hematology, Hospital Clinic, Institut d'Investigacions Biomediques August Pi I Sunyer (IDIBAPS), University of Barcelona, Barcelona, Spain; ⁴Department of Infectious Diseases, Institut d'Investigacions Biomediques August Pi I Sunyer (IDIBAPS), Hospital Clinic, University of Barcelona, Barcelona, Spain and ⁵Department of Pathology, Hematopathology Section, Hospital del Mar, Institut Mar d'Investigacions Mèdiques (IMIM), University Pompeu Fabra, Barcelona, Spain

Human herpesvirus 8 (HHV8)-associated lymphoid proliferations are uncommon and poorly characterized disorders mainly affecting immunosuppressed patients, especially with HIV infection. They encompass different diseases with overlapping features that complicate their classification. In addition, the role of HHV8 in reactive lymphoid hyperplasia is not well known. To analyze the clinicopathological spectrum of these lesions, we have reviewed 66 biopsies of 61 patients with HHV8 infection. All cases were also investigated for Epstein-Barr virus (EBV) and HIV infection. We identified 13 (20%) cases of HHV8-related reactive lymphoid hyperplasia, 2 (3%) HHV8 plasmablastic proliferations of the splenic red pulp, 28 (42%) multicentric Castleman disease, 6 (9%) germinotropic lymphoproliferative disorders, and 17 (26%) HHV8-related lymphomas. As expected, the pathologic subtype was predictive of overall survival ($P < 0.05$). Forty-seven of our cases were HIV positive (77%). In addition to the classical presentation of the different entities, we identified novel and overlapping features. Reactive HHV8 proliferations were frequently associated with systemic symptoms but never progressed to overt HHV8-positive lymphoma. Two cases had a plasmablastic proliferation limited to spleen. Eight cases of multicentric Castleman disease had a previously unrecognized presentation shortly after the diagnosis of HIV infection, six cases had cavity effusions, and three showed plasmablast enriched proliferations. One germinotropic lymphoproliferative disorder was EBV negative and three occurred in HIV-positive patients, who had distinctive clinical and morphological features. Two of the HHV8-related lymphomas did not fulfill the criteria for previously recognized entities. All these findings expand the clinical and pathological spectrum of HHV8-related lymphoid proliferations, which is broader than current recognized.

Modern Pathology advance online publication, 13 January 2017; doi:10.1038/modpathol.2016.233

Human herpesvirus 8 or Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (HHV8/KSHV) is a γ -herpesvirus that was first identified as the etiological agent of Kaposi sarcoma in 1994.¹ Shortly after, it has been associated with different B-cell proliferations such as primary effusion lymphoma,² and its solid variant,³

as well as most cases of multicentric Castleman disease,⁴ particularly in HIV-positive patients.⁵ While most of these lesions occur in the setting of HIV infection in HHV8 endemic areas, they may be also seen in other immunocompromised conditions.⁶ In 2002, germinotropic lymphoproliferative disorder was identified as a localized HHV8-related disease associated with Epstein-Barr virus (EBV) coinfection in immunocompetent patients.⁷ The updated 2016 World Health Organization classification includes the new category of HHV8-positive diffuse large B-cell lymphoma, not otherwise specified expanding

Correspondence: Dr B Gonzalez-Farre, MD or Dr A Martinez, MD, PhD, Pathology Department, Hospital Clinic, Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain.

E-mail: mbgonzal@clinic.ub.es or antonmar@clinic.ub.es

Received 15 September 2016; revised 24 November 2016; accepted 25 November 2016; published online 13 January 2017

Table 1 Main clinicopathological features of all cases

	Castleman disease					Lymphomas		
	RH	PBP-RP	MCD	PBR-MCD	GLPD	PEL	ecPEL	NOS
<i>Demographics</i>								
N	13	2	25	3	5	9	6	2
Age (range), years	37 (20–44)	40 (36–44)	45 (20–80)	30 (22–37)	47 (27–86)	49 (39–76)	45 (32–62)	53 (44–63)
Male/female, n	13/0	2/0	22/3	2/1	4/0	9/0	6/0	2/0
HIV, n	13	2	18	3	3	6	6	1
<i>Extent of disease</i>								
Localized, n (%)	2 (15)	2 (100)	4 (16)	—	2 (40)	—	—	1 (50)
Multiple sites, n (%)	10 (77)	—	17 (68)	3 (100)	3 (60)	—	5	1 (50)
Splenomegaly, n (%)	4 (31)	2 (100)	11 (44)	3 (100)	2 (40)	—	3 (50)	2 (100)
Effusions, n (%)	3 (23)	—	4 (16)	2 (67)	1 (20)	100	—	1 (50)
B symptoms, n (%)	7(54)	1 (50)	19 (76)	3 (100)	3 (60)	1 (11)	4 (67)	2 (100)
<i>Management</i>								
Only cART, n (%)	10 (77)	—	3 (12)	—	—	—	—	—
Immunotherapy, n (%)	—	—	3 (12)	—	—	—	—	—
Chemotherapy, n (%)	3 (23)	1 (50)	13 (52)	2 (67)	4 (80)	9 (100)	5 (84)	1 (100)
<i>Course</i>								
Complete remission, n (%)	11 (85)	1 (50)	16 (76)	2 (67)	2 (50)	—	1 (17)	1 (50)
Relapse, n (%)	—	—	—	—	—	1 (11)	—	—
Progressive disease, n (%)	—	—	4 (20)	—	1 (25)	7 (78)	3 (50)	1 (50)
Histologic transformation, n (%)	—	—	1 (5)	—	—	—	—	—
<i>Outcomes</i>								
Died of disease, n (%)	—	1 (50)	4 (18)	—	—	7 (78)	3 (50)	1 (50)
Died of unrelated cause, n (%)	1 (8)	—	3 (14)	1 (33)	—	—	—	1 (50)
Median (range) follow-up, months	38 (5–95)	19 (0–38)	14 (0–184)	33 (0–64)	11 (1–46)	2 (0–59)	5 (1–35)	24 (0–34)

Abbreviations: cART, combined antiretroviral therapy; ecPEL, extracaviatry primary effusion lymphoma; GLPD, germinotropic lymphoproliferative disorder; HIV, human immunodeficiency virus; MCD, multicentric Castleman disease; NOS, not otherwise specified; PBR-MCD, plasmablast-rich multicentric Castleman disease; PBP-RP, plasmablastic proliferation of the splenic red; pulpPEL, primary effusion lymphoma; RH, reactive follicular hyperplasia.

the spectrum of HHV8-driven malignant plasmablastic proliferations.⁸

In addition to these well-characterized HHV8-related lymphoproliferative disorders, occasional cases with atypical and overlapping features among entities have been recognized such as lesions intermediate between multicentric Castleman disease and germinotropic lymphoproliferative disorder in HIV-positive patients⁹ or cases of germinotropic lymphoproliferative disorder that progress to high-grade EBV and HHV8-positive lymphoma.¹⁰ These cases represent diagnostic challenges and suggest that the spectrum of the HHV8-related lesions may not be fully characterized. On the other hand, contrary to the well identified EBV-associated reactive hyperplasia with favorable outcome, especially under certain immunodeficiency conditions,¹¹ the prevalence and clinical meaning of HHV8 infection in reactive lymphadenitis have not been well recognized.

The aims of this study were to characterize the pathologic and clinical features of the whole spectrum of HHV8-related lymphoid lesions in a large cohort of cases from reactive hyperplasia to overt lymphomas. Our results expand the spectrum of

HHV8-positive lymphoproliferative disorders with the identification of novel lesions and previous unrecognized clinical and pathological manifestations of the well-defined entities.

Material and methods

Patients and Samples

All HHV8-related lymphoid proliferations with available tissue biopsies were collected from the files of Pathology Departments of the Hospital Clinic and Hospital del Mar, Barcelona, Spain between 2000 and 2015. The initial selection was obtained by an electronic search in laboratory informatics systems for 'HIV' and 'reactive lymphoid hyperplasia', 'Castleman disease' and 'primary effusion lymphoma' and for 'HHV8'. Unicentric cases of hyaline-vascular Castleman disease and cases of isolated Kaposi sarcoma were excluded. We found a total of 66 cases, including 13 cases of reactive lymphadenitis with scattered HHV8-positive lymphoid cells. All the cases were reviewed and reclassified based on morphological and phenotypic features. Available clinical data were collected from

Table 2 Main clinicopathological features of HHV8-related lymphoid hyperplasia

Gender/age	HIV	Presentation	Clinical features			Outcome, follow-up	HHV status			Molecular
			Treatment	Course			EBV	HHV8	IGHV	
#1 M, 25	Yes	Generalized LN B symptoms	Doxorubicin cART	Concomitant MCD 2 year later, high-grade B-cell lymphoma HHV8 negative	Dw/oD, 41 m	ND	Scattered interfollicular Kaposi sarcoma	ND	ND	
#2 M, 20	Yes	Generalized LN Pulmonary nodules	cART	One year later MCD	Aw/oD, 31 m	Scattered interfollicular	Scattered interfollicular Endothelial cells	ND	ND	
#3 M, 28	Yes	Laterocervical LN	—		Aw/oD, 95 m	Scattered interfollicular Intrafollicular colonization	Scattered interfollicular Endothelial cells	ND	ND	
#4 M, 37	Yes	Axillary, cervical LN B symptoms	cART		Aw/oD, 53 m	Scattered interfollicular	Scattered interfollicular	ND	ND	
#5 M, 30	Yes	Generalized LN, SMG, B symptoms	cART TB treatment		Aw/oD, 5 m	Negative	Scattered interfollicular, MZ	Polyclonal	Polyclonal	
#6 M, 41	Yes	Generalized LN B symptoms	cART		Aw/oD, 57 m	Scattered intra and interfollicular	Endothelial cells Scattered interfollicular Kaposi Sarcoma	Clonal	Clonal	
#7 M, 30	Yes	Generalized LN B symptoms	cART	Hodgkin lymphoma, 4 year later	Aw/oD, 70 m	Scattered interfollicular	Scattered interfollicular. GC Endothelial cells	Polyclonal	Polyclonal	
#8 M, 43	Yes	Unknown	cART		Aw/oD, 68 m	Scattered interfollicular	Scattered interfollicular	NA	NA	
#9 M, 37	Yes	Generalized LN	cART		Aw/oD, 68 m	Scattered interfollicular	Scattered inside GC, MZ Endothelial cells	ND	ND	
#10 M, 30	Yes	Supraclavicular LN, SMG, B symptoms	cART	Two months later PBR-MCD	Aw/oD, 35 m	ND	Scattered inside GC, MZ Kaposi sarcoma	ND	ND	
#11 M, 27	Yes	Generalized LN, effusions, SMG	R-CMyOP radiotherapy splenectomy cART		Aw/oD, 13 m	Scattered interfollicular	Scattered interfollicular	Polyclonal	Polyclonal	
#12 M, 44	Yes	B symptoms Generalized LN, effusions, SMG			Aw/oD, 8 m	Scattered interfollicular	Scattered interfollicular	Polyclonal	Polyclonal	
#13 M, 42	Yes	Isolated LN Effusions	Doxorubicin R-CMyOP cART	Concomitant PEL	AwD, 6 m	Scattered interfollicular	Scattered interfollicular, MZ Kaposi Sarcoma	ND	ND	

Abbreviations: AwD, Alive with disease; Aw/oD, alive without disease; Dw/oD, died without disease; EBV, Epstein-Barr virus; GC, germinal center; HHV, human herpesvirus; HHV8, human herpesvirus type 8; IGHV, immunoglobulin rearrangement; LN, lymph node; M, male; MZ, mantle zone; NA, not assessable; ND, not done; R-CMyOP, rituximab, cyclophosphamide, vincristine, prednisone, doxorubicin; SMG, splenomegaly; TB, tuberculostatic treatment.

Table 3 Main clinicopathological features of multicentric Castleman disease

	Clinical features				HHV status			Molecular	
	Gender/age	HIV	Presentation	Treatment	Course	Outcome, follow-up	EBV		HHV8
#14	M, 55	Yes	Inguinal, laterocervical LN, HSMG	Steroids		DwD, 1 m	Negative	MZ	NA
#15	M, 47	Yes	Generalized LN, B symptoms	Unknown	Unknown	Unknown	Scattered interfollicular Single interfollicular coinfection with HHV8	MZ, GC Single interfollicular coinfection with EBV	Polyclonal
#16	M, 34	Yes	Unknown	Unknown		Dw/oD, 51 m	Negative	MZ, GC	Polyclonal
#1	M, 25	Yes	Generalized LN, tonsil enlargement, HSMG	cART Doxorubicin	Concomitant RH and 2 years later high-grade B-cell lymphoma HHV8-	Dw/oD, 42 m	Scattered interfollicular	MZ, GC, interfollicular Kaposi Sarcoma	Polyclonal
#17	M, 36	Yes	Generalized LN, SMG, B symptoms	R-CP cART		Aw/oD, 39 m	Scattered interfollicular	MZ, GC Kaposi Sarcoma	Polyclonal
#18	M, 43	Yes	Generalized LN	Doxorubicin and Rituximab	5 months later PEL	DwD, 10 m	Scattered interfollicular	MZ, GC Kaposi Sarcoma	Polyclonal
#19	M, 43	Yes	B symptoms	cART CHOP		Aw/oD, 184 m	NA	MZ, GC Kaposi Sarcoma	Polyclonal
#20	M, 71	Yes	Axillary LN	R-CHOP	Concomitant FL	Aw/oD, 1 m	Scattered interfollicular	MZ Kaposi Sarcoma	Clonal
#21	M, 59	Yes	Generalized LN, SMG, effusions	CHOP		Aw/oD, 27 m	Scattered interfollicular	Mantle, GC, interfollicular	Polyclonal
#22	M, 36	Yes	Cervical LN	cART cART	Tuberculous meningoenophthalmitis	DwD, 4 m	Scattered interfollicular	MZ, interfollicular Endothelial cells	ND
#23	M, 33	Yes	Axillary LN, HSMG	Unknown		Aw/oD, 14 m	Scattered interfollicular	MZ	NA
#24	M, 54	Yes	Generalized LN, effusions, SMG	Burkimab cART Doxorubicin R-COP	Concomitant high-grade B-cell lymphoma HHV8-	Aw/oD, 117 m	Scattered interfollicular	MZ, GC, interfollicular Kaposi sarcoma	NA
#25	M, 61	Yes	Generalized LN, HSMG	R-COP		Aw/oD, 91 m	Negative	MZ, GC Kaposi sarcoma	Polyclonal
#2	M, 21	Yes	Generalized LN, SMG	Rituximab cART		Aw/oD, 15 m	Negative	MZ, GC, interfollicular Endothelial cells	ND
#26	M, 33	Yes	Submandibular LN	cART		Aw/oD, 57 m	Scattered interfollicular	MZ, interfollicular Kaposi sarcoma	ND
#27	M, 75	No	Unknown	Unknown		Unknown	Negative	MZ	ND
#28	F, 77	No	Generalized LN, SMG	R-COP		Dw/oD, 10 m	Scattered interfollicular Intrafollicular involvement	MZ MZ	Polyclonal
#29	M, 41	No	Generalized LN; constitutional syndrome	Rituximab, cyclophosphamide		Aw/oD, 67 m	Scattered interfollicular	MZ, interfollicular	Polyclonal
#30	F, 66	No	Generalized LN	CHOP Adriamycin	Relapse and progression	DwD, 21 m	Negative	MZ, GC Endothelial cells	Polyclonal

Table 3 (Continued)

Gender/age	HIV	Presentation	Clinical features			HHV status			Molecular
			Treatment	Course	Outcome, follow-up	EBV	HHV8	IGHV	
#31 F, 80	No	Unknown	Unknown		Unknown	Negative			NA
#32 M, 51	No	Generalized LN, hemolytic anemia, arthralgias B symptoms	Steroids Rituximab		DwD, 0 m	Negative		MZ, interfollicular Kaposi Sarcoma	Polyclonal
#33 M, 20	Yes	Generalized LN B symptoms	CHOP cART		Aw/oD	Scattered interfollicular		MZ	ND
#34 M, 71	No	Generalized LN, B symptoms SMG	Rituximab, cyclophosphamide vincristine cART		Aw/oD, 9 m	Scattered interfollicular		MZ, GC, interfollicular Kaposi Sarcoma	ND
#35 M, 40	Yes	Generalized LN B symptoms	Steroids	New biopsy after two months with similar histological features	Aw/oD, 8 m	Scattered interfollicular		MZ, GC, interfollicular Endothelial cells	ND
#36 M, 52	Yes	Generalized LN hypergammaglobulinemia B symptoms	Rituximab		AwD, 8 m	Scattered interfollicular		MZ, interfollicular Endothelial cells	Polyclonal
#37 ^a F, 22	Yes	Generalized LN, effusions, SMG, B symptoms	R-CHOP intrathecal RT R-CHOP cART		Aw/oD, 64 m Aw/oD, 33 m	Scattered interfollicular Negative		MZ, GC, interfollicular MZ, GC Kaposi sarcoma	Polyclonal
#10 ^a M, 30	Yes	Supraclavicular LN, SMG, effusions, B symptoms	—		DwD, 0 m	Negative		MZ, GC, interfollicular	ND

Abbreviations: Burkimab, Rituximab, methotrexate, dexametasona, ifosfamide, vincristine, etoposide, Cytarabine; CHOP, Rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, prednisone; DwD, Dead with disease; F, female; FL, follicular lymphoma; HSMG, hepatosplenomegaly; R-CP, Rituximab, prednisone and cyclophosphamide; RT, radiotherapy.
^aPBR-MCD; plasmablastic-rich multicentric Castleman disease.

Table 4 Main clinicopathological features of germinotropic lymphoproliferative disorders

Gender/age	HIV	Clinical features				Immunophenotype				Molecular			
		Presentation	Treatment	Outcome, follow-up	B-cell markers	T-cell markers	MUM1	K/L	EBV/HHV8	Tumor growth	IGHV	TCR	
#39	M, 86	-	Submental LN	Watch&wait	Aw/D 3 m	CD20 & CD79a weak, PAX5- CD20, PAX5 & CD138 weak and focal	CD3+	+	K	-/+	GC	Polyclonal	Polyclonal
#40	M, 52	-	Inguinal LN for 3 years	CHOP	—	—	—	+	-	+/+	GC	Polyclonal	NA
#41	M, 47	+	Generalized LN, effusion, SMG, B symptoms	CHOP	Aw/od 11 m	—	—	+	-	+/+	GC+outer zone	Clonal	Polyclonal
#42	M, 27	+	Generalized LN, B symptoms	Rituximab	Aw/D 10 m	CD20 & CD79a+	CD3 weak and focal	+	K	+/+	GC+outer zone	Polyclonal	Polyclonal
#42	M, 30	+	Generalized LN, B symptoms	R-DA-EPOCH HSCT	Aw/D 46 m	CD20 & CD79a+	CD3 weak and focal	+	K	+/+	GC+outer zone	Clonal	ND
#43	M, 42	+	Generalized LN, effusion, SMG, B symptoms	R-EPOCH	Aw/od 4 m	CD20+	—	+	L	+/+	GC+outer zone	Polyclonal	ND

Abbreviations: HSCT, hematopoietic stem cell transplantation; K, kappa light chain; L, lambda light chain; R-DA-EPOCH, Rituximab, vincristine, adriamycin, cyclophosphamide, methylprednisolone; TCR, T-cell receptor rearrangement.

all patients including the type of immunosuppression, prior or concomitant Kaposi sarcoma, clinical symptoms, sites of involvement, treatment, response to therapy, and follow-up. The main clinicobiological characteristics of all the patients are summarized in Table 1.

The study was performed according to the guidelines of the ethic committees of Hospital Clínic and Hospital del Mar.

Immunohistochemistry and Hybridization Studies

Immunohistochemical studies were carried out in all samples with a panel of monoclonal and polyclonal antibodies reactive in formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections using a peroxidase-labeled detection system, standard antigen retrieval protocols, and an automated immunostainer (Dako OMNIS, Glostrup, Denmark or BenchmarkXT, Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) as previously described.¹² Detection of the HHV8 was performed using a mouse monoclonal antibody (HHV8-LANA1; clone 13B10; Cell Marque, Hot Springs, AR, USA). EBV was detected by *in situ* hybridization using Epstein-Barr virus encoded small RNA (EBER1,2) probes (Leica BOND-MAX system; Leica Biosystems Newcastle upon Time, UK).

IGH Gene Rearrangements

DNA for the study of IGHV and IGK gene rearrangements was extracted from tissue sections using the QIAamp DNA mini kit (Qiagen, Hilden, Germany). Purified DNA was amplified using primers of the Framework Regions 1 and 3 (FR1 and FR3) and JH regions of the immunoglobulin heavy chain gene (IgH-PCR) and of Vk–Jk region of the immunoglobulin kappa light chain gene (IGK), using the BIOMED2 protocol.¹³

Statistical Methods

Differences among the subgroups of patients were assessed by using the χ^2 test (two-tailed). The actuarial survival analysis was performed by the Kaplan and Meier method and log-rank test. Overall survival was calculated according to standard definitions.¹⁴

Results

The histological and phenotypic review allowed the classification of the cases in five main categories: (1) HHV8-positive reactive lymphoid hyperplasia; (2) plasmablastic proliferation of the splenic red pulp; (3) multicentric Castleman disease; (4) germinotropic lymphoproliferative disorder; and (5) HHV8-related lymphomas. The main clinical and pathological

Table 5 Main clinicopathological features of lymphomas

	Gender/age	HIV	Presentation	Clinical features			HHV status	
				Diagnosis	Treatment	Outcome, follow-up	EBV	HHV8
#44	M, 53	Yes	Ascites B symptoms	PEL	CHOP MINE/ESHAP cART	DwD, 19 m	ND	+
#45	M, 64	No	CSF	PEL	CHOP	DwD, 1 m	+	+
#46	M, 49	No	Pleural effusion, ascites	PEL	Chemotherapy	DwD, 3 m	-	+
#47	M, 76	Yes	Pleural effusion	PEL	COP cART	DwD, 1 m	+	+
#48	M, 39	Yes	Pleural effusión Nodal KS	PEL	R-CHOP	DwD, 2 m	ND	+
#49	M, 68	No	Pleural effusion	PEL	CTX	DwD, 0 m	+	+
#50	M, 46	Yes	Pleural effusion Nodal KS	PEL	CHOP	Relapse after 1 year Aw/oD, 59 m	+	+
#51	M, 49	Yes	Ascites B symptoms	PEL	CHOP	DwD, 2 m	+	+
#13	M, 42	Yes	Pleural effusion, ascites Axillary LN	PEL	R-CMyOP ESHAP	AwD, 6 m	-	+
#52	M, 62	Yes	Generalized LN, SMG Constitutional syndrome	Extracavitary PEL	COP cART	DwD, 1 m	+	+
#53	M, 49	Yes	Generalized LN, subcutaneous mass, SMG B symptoms	Extracavitary PEL	CHOP MTX intrathecal	Aw/oD, 35 m	ND	+
#54	M, 36	Yes	Duodenal mass	Extracavitary PEL	Chemotherapy	DwD, 1 m	+	+
#55	M, 32	Yes	Mesenteric LN proctitis, B symptoms	Extracavitary PEL	CTX, PDN R-CHOP cART	AwD, 18 m	+	+
#56	M, 49	Yes	Bilateral suprarenal masses, SMG B symptoms	Extracavitary PEL	CHOP cART	DwD, 5 m	+	+
#57	M, 42	Yes		Extracavitary PEL			+	+
#58	M, 44	Yes	Generalized LN, B symptoms, effusions, SMG	HHV8 DLBCL	CTX	DwD, 0 m	+	+
#59	M, 63	No	SMG	HHV8 DLBCL	Splenectomy R-CHOP	Dw/oD, 34 m	-	+

Abbreviations: CMYOP, rituximab, cyclophosphamide, vincristine, prednisone, doxorubicin; CSF, cerebrospinal fluid; CTX, Cyclophosphamide; DLBCL, diffuse large B-cell lymphoma; MINE, mesna, ifosfamide, mitoxantrone, and etoposide alternated with ESHAP, etoposide, methylprednisolone, high-dose cytarabine and cisplatin; MTX, methotrexate; KS, Kaposi sarcoma; PDN, prednisone.

characteristics of these groups are described separately and summarized in Tables 2–5.

HHV8-Related Reactive Lymphoid Hyperplasia in HIV Patients

Histological, immunophenotypic, and molecular features. We investigated the presence of HHV8 in a series of 50 cases diagnosed as HIV-associated reactive lymphadenitis and identified 13 (26%) cases harboring HHV8-positive cells. The overall architecture of the lymph nodes was preserved with opened sinuses and at least partially recognized lymphoid follicles. Two different histological patterns were identified. Nine cases showed typical features of follicular and paracortical hyperplasia with folliculolysis (Figure 1a), and four cases had marked lymphoid depletion with completely 'burnt out' follicles and prominent stromal cell proliferation (Figure 1c). Scattered HHV8-positive cells were seen

in all cases, either in the interfollicular areas, mantle zones or inside the germinal centers (Figure 1b and d). Unlike multicentric Castleman disease none of the cases of HHV8-related reactive lymphoid hyperplasia exhibited follicles with vascular proliferation, thick and hyalinized walls, or hyalinization of germinal centers. Massive interfollicular plasmacytosis was not observed in any case. Five cases also exhibited scattered endothelial HHV8-positive cells. Additionally, four cases showed overt Kaposi sarcoma in the same lymph node capsule. In one case, the follicular dendritic cells in the germinal centers showed cytoplasmic positivity for HHV8 (Figure 1b). Scattered EBV-positive small lymphocytes were observed in 10 out of the 11 cases analyzed. One case also had reactive germinal centers massively infected by EBV. Although double stains were not performed, the different topographic distribution of the HHV8 and EBV-positive cells did not suggest coinfection.

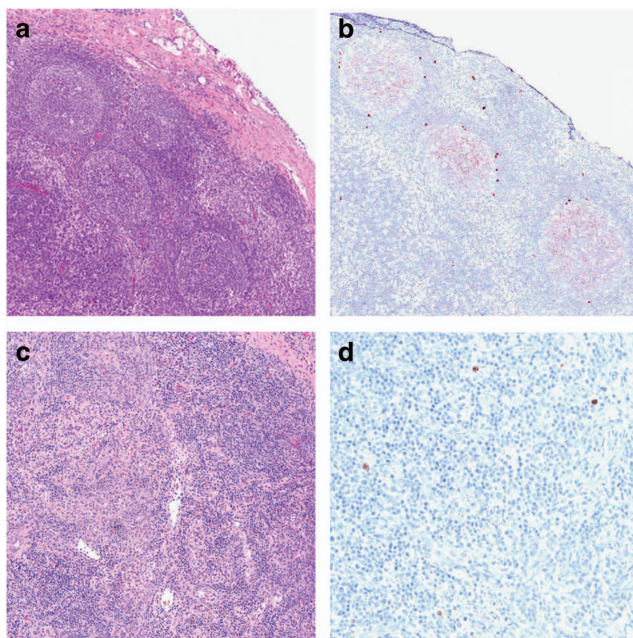


Figure 1 Histologic features of HHV8-related reactive lymphoid hyperplasia. (a, H&E) Case #13, reactive follicular hyperplasia showing (b, HHV8-LANA1) HHV8-positive cells in the mantle zones and cytoplasmic dendritic cell staining. (c, H&E) Case #12, reactive lymph node with 'burnt out' follicles and prominent stromal cell proliferation also displaying (d, HHV8-LANA1) scattered HHV8-positive lymphoid cells (original magnifications: $\times 40$ (a, c) and $\times 100$ (b, d)).

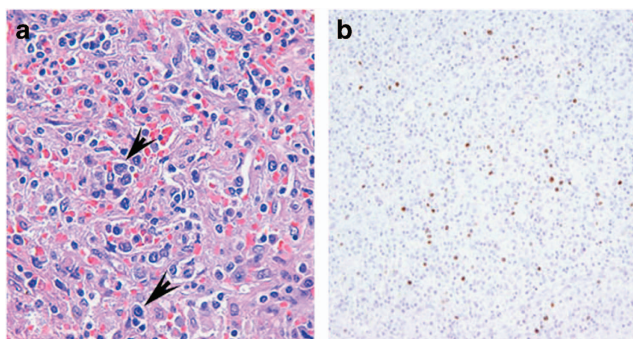


Figure 2 Histologic features of HHV8-positive plasmablastic proliferation of the splenic red pulp. (a, H&E) Presence of plasmablasts inside splenic sinuses positive for (b, HHV8-LANA1) HHV8 stain (original magnifications: $\times 400$ (a) and $\times 100$ (b)).

Four patients had consecutive or simultaneous biopsies during the follow-up. Three patients had simultaneous or subsequent multicentric Castleman disease and one patient had a concomitant HHV8-positive primary effusion lymphoma that was negative for EBV.

Molecular studies for IGHV rearrangements were performed in five cases. Four were polyclonal and one showed a monoclonal peak in FR2 region consistent with clonality. After review, no morphological evidence of lymphoma was seen in that particular case.

Clinical features. All patients were male, median age 37 years (range, 20–44 years), and median time from the HIV-infection diagnosis to the lymph node biopsy of 27 months (1–167). Lymph node enlargement in more than one area was observed in nine patients and four of them also had splenomegaly. B symptoms were present in seven patients and one patient had also increased lactate dehydrogenase levels. All but two patients were treated with combined antiretroviral therapy and three patients also received chemotherapy. One patient received doxorubicin for Kaposi sarcoma and another, initially diagnosed as multicentric Castleman disease, was treated with immunochemotherapy and splenectomy. The spleen did not show any features of multicentric Castleman disease and after review the initial lymph node biopsy was re-considered as HHV8-related reactive lymphoid hyperplasia. The last patient received immunochemotherapy due to simultaneous primary effusion lymphoma. After a median follow-up of 38 months (5–95 months) all patients except the one with concomitant primary effusion lymphoma have recovered of all symptoms and have no evidence of disease.

HHV8-Positive Plasmablastic Proliferation of the Splenic Red Pulp

Histological, immunophenotypic, and molecular features. Two cases were included in this category. Both cases had large spleens (over 1000 g), one from a surgical splenectomy and the second from an autopsy. The overall architecture was preserved with expanded white pulp and scattered large atypical plasmablasts in the red pulp sinuses and cords with few of them also in the white pulp. Both cases had myeloid metaplasia. No histological evidence of multicentric Castleman disease was identified. HHV8 stain highlighted the intrasinusoidal-positive plasmablasts (Figure 2). HHV8-positive cells were also occasionally seen in the reactive white pulp in both cases. The EBV *in situ* hybridization showed scattered positive intrasinusoidal small lymphocytes. Clonality analysis for IGHV showed a monoclonal peak in FR2 region in one case and a polyclonal pattern in the FR3 region in the autopsy case. No evidence of any other lymphoid lesions was observed at the autopsy in the second patient.

Clinical features. One patient was a 44-year-old male without relevant past medical history and recent HIV diagnosis (4 months ago) and Kaposi sarcoma, who presented with very low CD4 counts (4 cells/ml), high viral load (157200 copies/ml), fever, giant splenomegaly, and pancytopenia. After splenectomy, he received four cycles of rituximab and was alive without evidence of disease after 40 months of follow-up. The second patient was a 36-year-old man with an 8-year history of HIV infection. The patient discontinued combined antiretroviral

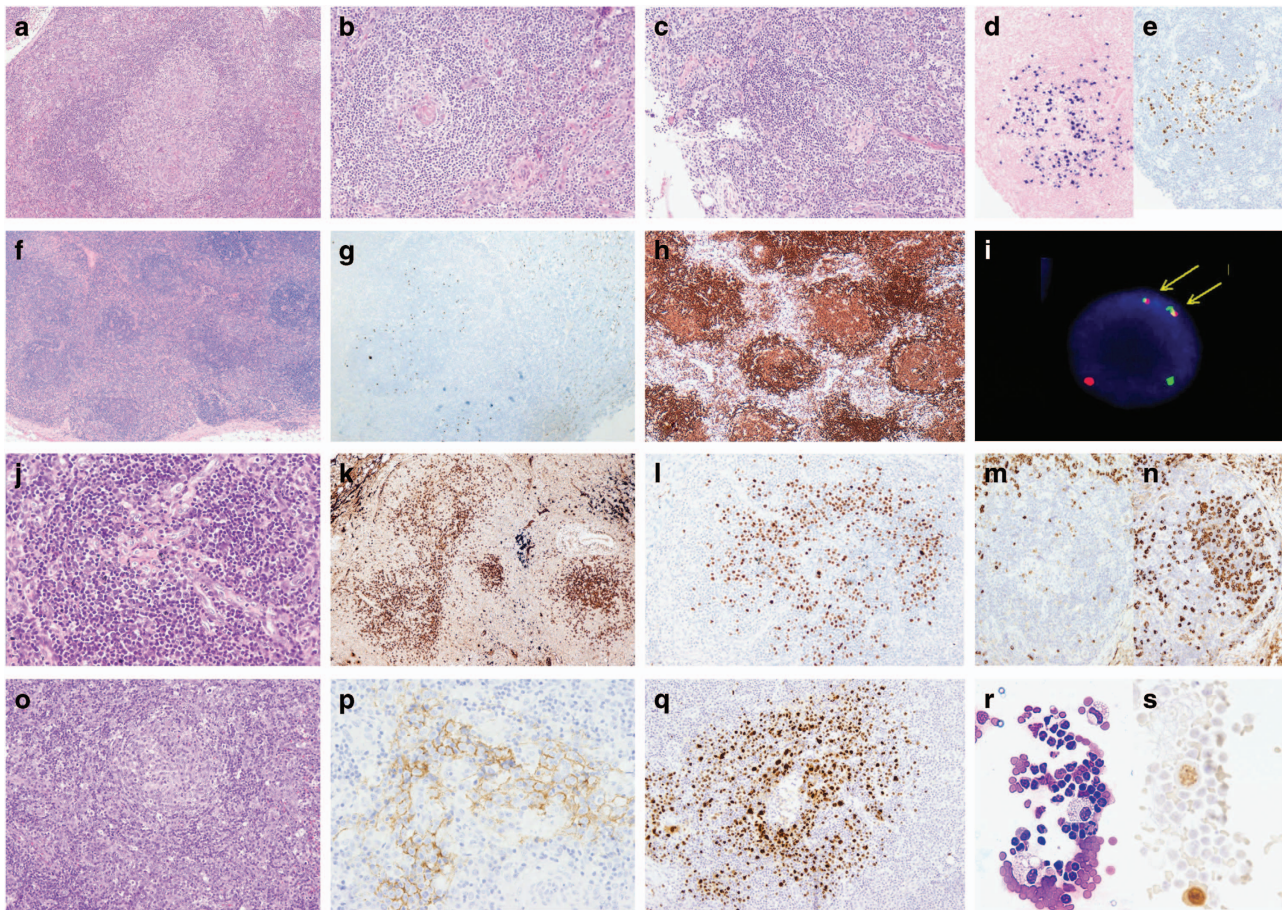


Figure 3 Histologic features of multicentric Castleman disease. (a–e) Case #15 of multicentric Castleman disease with typical features. (a, H&E) Hyalinized germinal centers are enclosed by a common mantle zone. (b, H&E) Atrophic follicle with hyalinized germinal center shows penetrating venule. Interfollicular plasmacytosis and prominent vascularization is also observed. (c, H&E) In the same lymph node, only one ill defined and depleted follicle was present and showed coinfection by (d, EBER) EBV and (e, HHV8-LANA1) HHV8. (f–i) Case #20 of multicentric Castleman disease with concomitant grade 1 follicular lymphoma. (f, H&E) Neoplastic-depleted follicles are surrounded by prominent interfollicular expansion with vascular proliferation and plasmacytosis. (g, HHV8-LANA1) HHV8-positive cells are found in the follicles and in the Kaposi sarcoma cells. (h, BCL2) All germinal centers are strongly positive for BCL2 and (i) FISH dual color dual fusion studies highlighted the presence of t(14;18) translocation. (j–n) Case #10 of plasmablast-rich multicentric Castleman disease. (j, H&E) Atrophic and highly vascularized germinal center are found with prominent mantle zones that intrude into the germinal centers. (k, IgD) IgD stain highlights the mantle zone proliferation with (l, HHV8-LANA1) the presence of large HHV8-positive cells with (m, Kappa light chain; n, lambda light chain) lambda light chain restriction. (o–s) Case #37 plasmablast-rich multicentric Castleman disease with (o, H&E) preserved follicles and expanded mantles show a high number of plasmablasts. (p, CD21) The CD21 staining highlights the partially disrupted follicular dendritic cell meshwork. (q, HHV8-LANA1) HHV8 staining revealed the presence of high number of plasmablasts limited to the follicles. No sheets of neoplastic cells are found. (r, Giemsa) Pleural effusion shows scattered plasmablasts. (s, HHV8) HHV8-positive in a background of small lymphocytes and histiocytes (original magnifications: $\times 40$ (f), $\times 100$ (b, c, g, h, k, o), $\times 200$ (a, d, e, j, l–n, q), $\times 400$ (p), and $\times 600$ (r, s)).

therapy and had very low CD4 counts (1 cell/ml) and high viral load ($> 50\,000$ copies/ml). He developed severe pancytopenia and disseminated Kaposi sarcoma with mycoplasma infection and died few days after admission to the hospital.

Multicentric Castleman Disease HHV8-positive

Histological, immunophenotypic, and molecular features. Twenty-eight cases fulfilled criteria for multicentric Castleman disease, with abnormal follicles with plasmablasts in the mantle zones and marked vascular proliferation with striking

plasmacytosis in the interfollicular area. In nine cases (32%), the follicular architecture was difficult to assess on H&E due to a prominent vascular proliferation with marked regressive follicles that were only evident with the follicular dendritic cell staining. As expected, the plasmablasts were strongly positive for IgM with lambda light chain restriction in all cases whereas the interfollicular plasma cells were polytypic. All cases had atypical HHV8-positive plasmablasts in the mantle zone and in 16 cases positive cells in the germinal centers were also observed (Figure 3). Cytoplasmic HHV8 positivity in follicular dendritic cells was observed in five cases.

EBV-positive small lymphocytes were detected in the interfollicular areas of 18 cases, but the total number of EBV infected cells was usually low (< 5 cells in 10 high-power field). However, one case also exhibited a solitary germinal center with coinfection of EBV and HHV8, mimicking a germinotropic lymphoproliferative disorder. Nevertheless, the coinfecting cells lacked immunoblastic morphology and only partially filled the regressive follicle. The remaining follicles of the node had the typical features of multicentric Castleman disease (Figure 3a–e).

Three cases had atypical multicentric Castleman disease features with an overgrowth of plasmablasts reminiscent of a germinotropic lymphoproliferative disorder or microlymphoma arising in multicentric Castleman disease (Figure 3j–s). All three cases had regressive follicles with mantles zones intruding and replacing the germinal centers accompanied with interfollicular plasmacytosis and vascular proliferation. Although high number of intrafollicular IgM lambda plasmablasts was identified, the germinal centers were not massively replaced and EBV was negative in all cases. None of these cases had shedding of plasmablasts replacing the normal nodal architecture and we thoughtfully named these cases as plasmablast-rich multicentric Castleman disease.

Six cases presented with effusions and cytological specimens were available in five cases, three corresponding to classical multicentric Castleman disease and two of plasmablast-rich multicentric Castleman disease. Very few HHV8-positive plasmablasts were detected in one case of multicentric Castleman disease and in both cases of plasmablast-rich multicentric Castleman disease in a background of reactive small lymphocytes. None of them had features of primary effusion lymphoma (Figure 3r–s).

In five patients consecutive biopsies were performed during the follow-up of their disease. Four patients had simultaneous or subsequent lymphomas, one primary effusion lymphoma, two high-grade B-cell lymphomas, not otherwise specified, and one follicular lymphoma. One patient had two biopsies in a 2-month period with similar histological features. The concomitant follicular lymphoma was grade 1, positive for the t(14;18) and BCL2 overexpression, and the tumor cells were negative for EBV and HHV8 (Figure 3f–i). The bone marrow showed infiltration by follicular lymphoma and scattered interstitial HHV8-positive cells. Concomitant Kaposi sarcoma was found in 11 cases and scattered HHV8-positive endothelial cells without evidence of Kaposi sarcoma were seen in five additional cases.

IGHV gene rearrangement was successful in 16 cases. A monoclonal rearrangement was only found in the case with concomitant follicular lymphoma. All remaining cases were polyclonal, including two of three plasmablast-rich multicentric Castleman disease cases.

Clinical features. Twenty-four patients were male and four female (median age, 43 years; range, 20–80 years). Twenty-one cases were HIV positive (75%) with a median time since the HIV diagnosis to the lymph node biopsy of 18 months (0–182); 40% (8/21) developed the disease during the first year after the diagnosis of HIV infection. At the time of biopsy, 14 patients had low CD4 counts (< 200/mm³) and/or high HIV viral load (> 20 000 copies/ml). Among HIV-negative patients, two had a potential underlying cause of immunosuppression: one patient had a systemic lupus erythematosus treated with immunosuppressive drugs and the other patient received chemotherapy for a colon adenocarcinoma. Four additional HIV-negative patients were aged more than 65 years old and immunosenescence could induce certain level of immunosuppression. Eighteen patients presented with lymphadenopathies involving more than one region and 13 also had splenomegaly. Systemic inflammatory symptoms were observed in 22 patients. Fifteen patients were treated with chemotherapy and 10 with rituximab. Three cases only received rituximab. Four patients were only treated with combined antiretroviral therapy and/or steroids, two of them because of poor performance status and they died shortly after diagnosis.

Germinotropic Lymphoproliferative Disorder HHV8-Positive

Histological, immunophenotypic, and molecular features. Six lesions from five patients were included in this category. All cases had overall preserved architecture with follicular involvement by a plasmablastic proliferation mainly confined to the germinal centers but with some extension to the adjacent areas (Figure 4a–d). Prominent polytypic plasmacytosis was present in the expanded interfollicular areas of all cases. The expression of B-cell markers in the plasmablastic proliferation was heterogeneous, being either weakly positive or negative for CD20 and CD79a. One case had focal expression of CD138. Three cases coexpressed CD3 but other T-cell markers were negative. All cases were positive for IRF4. Coinfection of HHV8 and EBV in the same tumor cells, as previously described, was observed in five samples, but one case was EBV negative. In this case, the tumor cells were confined into the germinal center and the dendritic cell meshwork was displaced to the periphery of the follicle. The tumor cells expressed kappa light chain restriction (Figure 4e–h).

Molecular studies for IG rearrangements were performed in all six samples. Three cases were polyclonal for IGHV and two were clonal, one in Vk–Jk and the other in FR3 region. T-cell receptor clonal rearrangements were not detected in any case.

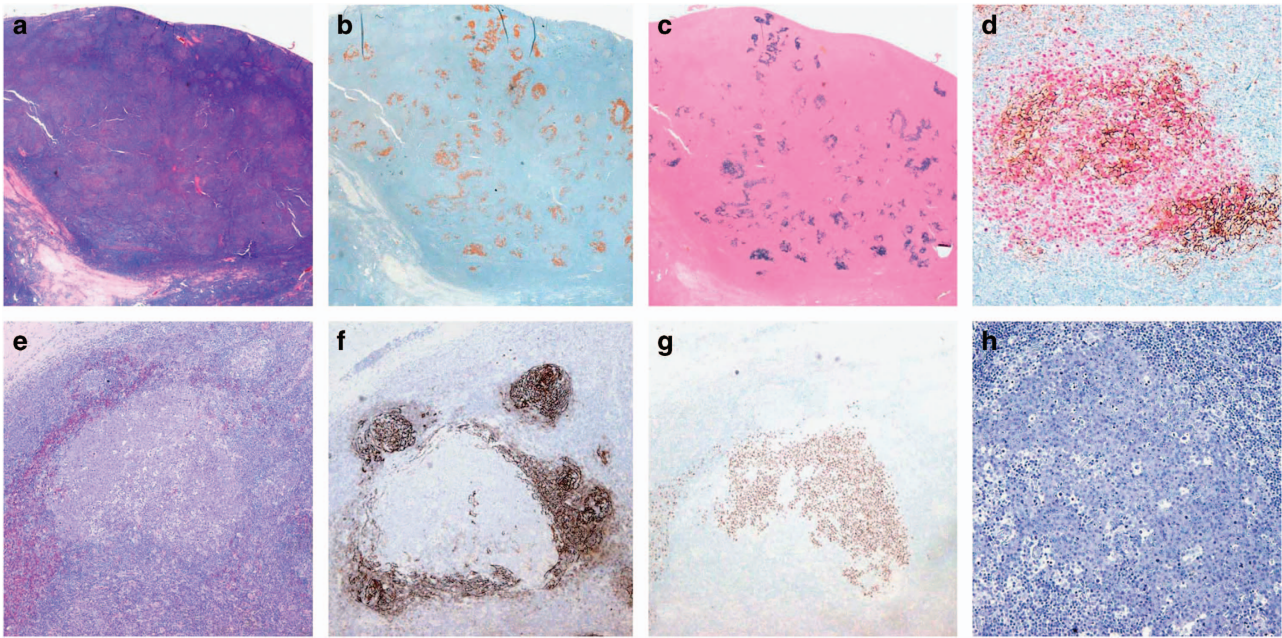


Figure 4 Histologic features of germinotropic lymphoproliferative disorder. (a–d) Case #42 of germinotropic lymphoproliferative disorder in an HIV patient with (a, H&E) overall preserved architecture and expanded follicles filled with (b, HHV8-LANA1) HHV8 and (c, EBER) EBV-positive plasmablasts. (d, CD21 and HHV8-LANA1) Double stain for HHV8 and CD21 highlights the partial disruption of the follicular dendritic cell network. (e–h) Case#39 of EBV-negative germinotropic lymphoproliferative disorder in an HIV-negative patient. (e, H&E) The enlarged germinal centers are replaced by plasmablastic cells that coalesce and form clusters limited to the germinal center. (f, CD21) CD21 staining shows that HHV8-positive cells occur within a follicular dendritic cell meshwork disrupted and pushed out at the periphery. (g, HHV8-LANA1) The plasmablasts are positive for HHV8 but (h, EBER) negative for EBV (original magnifications: $\times 20$ (a–c), $\times 40$ (e–g), $\times 100$ (d), and $\times 200$ (h)).

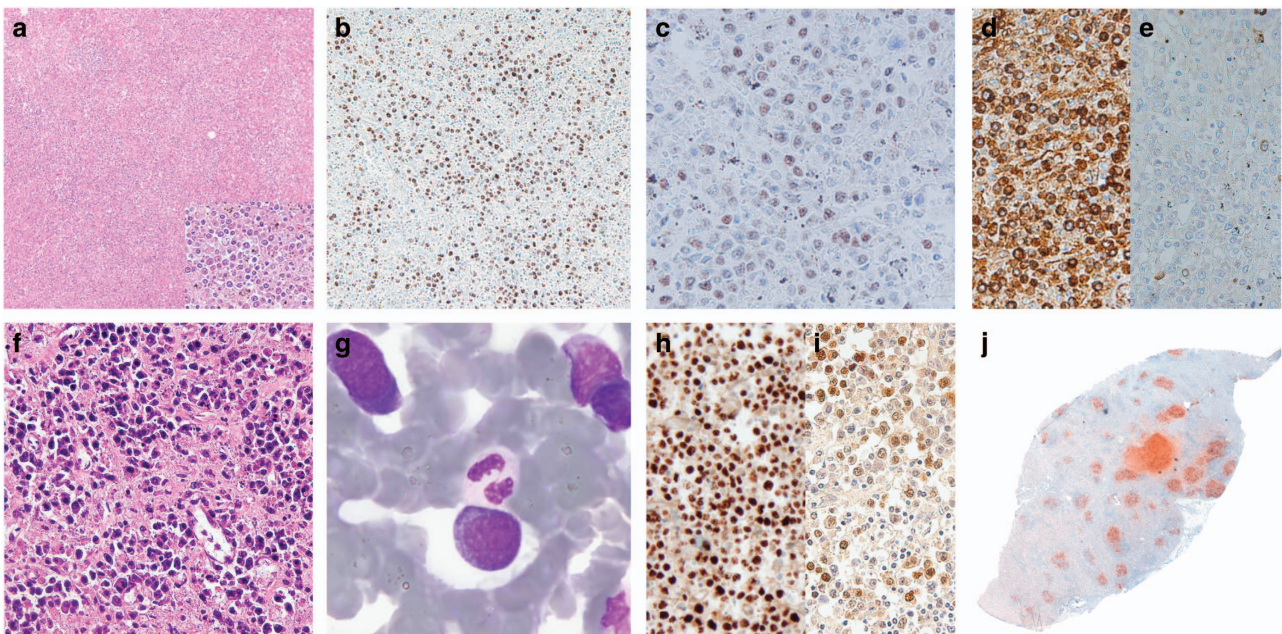


Figure 5 Histologic features of HHV8 lymphomas. (a–e) Case#59 of primary splenic HHV8-positive lymphoma (a, H&E) Effacement of the splenic architecture by large atypical plasmablasts (b, HHV8-LANA1) positive for HHV8 and (c, Blimp1) with expression of PRDM1/BLIMP1, a transcription factor associated with plasma cell differentiation. (d, lambda; e, kappa) The tumor cells showed clear lambda light chain restriction. (f–j) Case#58 of HHV8-positive lymphoma. (f, H&E) Pericardial involvement by sheets of atypical plasmablasts with extensive necrosis. (g, Giemsa) Peripheral blood showed leukemic involvement by large atypical plasmablasts with eccentric nuclei (h, HHV8-LANA1) The tumor cells were positive for HHV8 (i, EBER) and some of them also coexpressed EBV. (j, HHV8-LANA1) At autopsy, one of the lymph nodes showed partially preserved architecture with HHV8-infected cells limited inside the follicles mimicking germinotropic lymphoproliferative disorder (original magnifications: $\times 1$ (j), $\times 100$ (a), $\times 200$ (b), $\times 400$ (c–f, h–i), and $\times 1000$ (g)).

Clinical features. All patients were male, with a median age of 47 years (27–86 years). Three were HIV positive, with a median time from the HIV diagnosis of 59 months (35–88 months). These patients presented with atypical features such as generalized lymphadenopathy and B symptoms and were treated with chemotherapy. One of them was initially only treated with rituximab and achieved partial response with later disease progression. A new biopsy under progression revealed similar features and the patient received then chemotherapy. After a median follow-up of 12 months, all three patients were alive, one of them with persistence of disease.

Two patients were HIV negative. One was an 86-year-old man with large localized cervical adenopathy. The patient did not receive any additional treatment and at 3 months of follow-up remained with stable disease. The last patient was a 52-year-old man with localized inguinal disease for 3 years without B symptoms. After the diagnosis the patient was treated with chemotherapy regimen including cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine and prednisone. Follow-up was not available.

HHV8-Positive B-Cell Lymphomas

Histological, immunophenotypic, and molecular features. We identified 17 cases with overt HHV8-positive B-cell lymphoma. Fifteen were primary effusion lymphoma, nine patients presenting with pleural effusion and/or ascites and six patients as mass-forming lesions (extracavitary primary effusion lymphoma). Interestingly, one case presented exclusively with cerebrospinal fluid involvement. All cases exhibit immunoblastic or plasmablastic features with immunophenotypic features of plasma cell differentiation (IRF4+, CD138+ and negative or weak expression of mature B-cell markers). Ten of 13 cases studied were coinfecting with EBV. Aberrant expression of CD3 was seen in four cases. Three cases had variable expression of CD30 and one of them also coexpressed CD15. Six of the 15 patients had lymph node enlargement. Two of them showed massive infiltration by Kaposi sarcoma, one case had a massive and exclusive sinusoidal involvement by lymphoma cells and three cases had a reactive follicular hyperplasia, only one with HHV8-positive cells.

The other two overt HHV8-positive lymphomas had particular features. One of them could correspond to the new World Health Organization category, HHV8-positive diffuse large B-cell lymphoma, not otherwise specified. In this patient, the lymphoma involvement was limited to the spleen which had a complete effacement of the architecture by a diffuse proliferation of large atypical HHV8-positive, EBV-negative cells with plasmablastic differentiation. (Figure 5a–e) Residual areas of multicentric Castleman disease or germinotropic

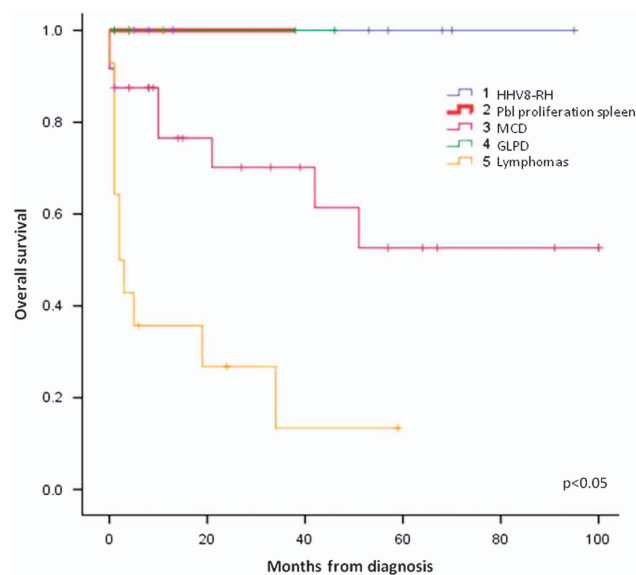


Figure 6 Overall survival by pathology subgroup.

lymphoproliferative disorder were not detected. The atypical cells expressed cytoplasmic IgM lambda and were focally positive for CD79a and IRF4 with strong PRDM1/BLIMP1 expression.

The last case had morphologic features that did not fulfill the criteria for any of previously described B-cell malignancies associated with HHV8 infection. It was a widespread disease with aggressive behavior and leukemic, nodal, hepatosplenic, bone marrow, and pericardial involvement. At autopsy, a large cell lymphoma with immunoblastic features was observed in all these sites (Figure 5f–g). Although in some cells EBV and HHV8 coinfection was observed, the numbers of HHV8-infected cells outnumbered the EBV-positive cells (Figure 5h–l). Intriguingly, one lymph node showed also residual follicles exhibiting features reminiscent of germinotropic lymphoproliferative disorder, raising the possibility of a transformation from germinotropic lymphoproliferative disorder (Figure 5j).

Clinical features. All primary effusion lymphoma patients were male with a median age of 49 years; range, 32–76 years. All patients were immunosuppressed: 12 patients were HIV positive; one has a prior history of liver transplantation 10 months ago, one was under steroid therapy for interstitial lung disease and the last patient was previously treated for a Hodgkin lymphoma and colorectal carcinoma. All patients received chemotherapy and 10 died with a median survival of 2 months (0–19 m).

The patient with HHV8+ diffuse large B-cell lymphoma, not otherwise specified, was an HIV-negative 63 years old male. The patient had splenomegaly and B symptoms and was staged as I–E and thus treated with splenectomy and four cycles of rituximab plus cyclophosphamide,

doxorubicin, vincristine, and prednisone. He recovered from all symptoms and the patient died of cardiac arrest 3 years after the diagnosis with no evidence of lymphoma.

The last patient with overt aggressive lymphoma was a 44-year-old HIV male who presented with malaise and pericardial effusion. The patient died without receiving any chemotherapy due to rapidly progressive disease and respiratory failure.

Comparative Analysis Between HHV8-Related Pathological Groups

There were no statistical differences in age or gender distribution between groups. As expected, the five HHV8-related pathology subgroups significantly differed in overall survival ($P < 0.05$; Figure 6).

Discussion

Human herpesvirus 8 (HHV8 or KSHV) is a herpesvirus that infects both lymphoid and endothelial cells. The virus drives Kaposi sarcoma and lymphoid neoplasms, especially in immunosuppressed patients mainly in the setting of HIV infection. Similarly to EBV (human herpesvirus 4),¹⁵ the oncogenic transformation occurs following the initial infection, when the virus establishes a latent phase. As in EBV infection, a variety of lymphoid proliferations from reactive hyperplasia to overt lymphoma may occur. Nevertheless, the wide spectrum of HHV8-related lymphoid lesions, including HHV8-positive reactive conditions, are not fully characterized. Here, we present a series of 66 cases encompassing different HHV8 lymphoproliferative disorders in HIV-positive and -negative patients that have allowed us to identify novel findings including overlapping features among entities, atypical clinical and morphological presentations as well as cases that did not fit in any of the previously described categories, suggesting that the spectrum of HHV8-related lymphoid proliferations may be broader than currently recognized.

We recognized 13 cases of reactive lymphoid hyperplasia in the context of HIV infection, in which HHV8-positive plasmablasts were identified. Some of these patients presented clinically with generalized lymphadenopathy and systemic inflammatory symptoms that were reminiscent of the recently described Kaposi sarcoma virus related inflammatory cytokine syndrome (KICS) related to viral IL6 secretion. Although the histological substrate of these lesions is not well characterized, all these cases lacked features of multicentric Castleman disease.^{16,17} In our reactive HHV8+ cases, the serum IL6 levels were not studied and thus we cannot confirm whether they may correspond to KICS. Despite the fact that all our reactive HHV8+ cases lacked features of multicentric Castleman disease, a subsequent or concomitant biopsy showed a

multicentric Castleman disease in three patients. This finding suggests that some of these lesions may either overlap or transform, highlighting the importance of performing nodal biopsies if clinical symptoms persist. It is not easy to assess if these infected cells in these reactive cases are bystander circulating cells or represent an early stage of multicentric Castleman disease since the number of cases is very limited. One of the patients who developed multicentric Castleman disease 2 months later under combined antiretroviral therapy had already infected cells in the reactive mantle zones. However, this pattern is very rare since most of the cases only harbored scattered infected cells in the interfollicular areas and never progressed to multicentric Castleman disease.

We also report two cases of HHV8-positive plasmablastic proliferation of the splenic red pulp in highly immunosuppressed HIV-positive patients. The HHV8-positive cells were mainly detected inside sinuses and cords. Although scattered HHV8 plasmablasts were also seen in reactive white pulp, criteria of any other HHV8-related disorder were not recognized. One of these patients died of disseminated Kaposi sarcoma and no evidence of HHV8 plasmablastic proliferation outside the spleen was observed at autopsy. To our knowledge no previous reports on similar proliferations have been reported. Whether these cases are related to primary splenic presentation of HHV8-positive diffuse large cell lymphoma has to be still elucidated.¹⁸

The most common lesion in our cohort was multicentric Castleman disease and 21 of the 28 patients were HIV positive. Multicentric Castleman disease in HIV-positive patients usually develops around 3 years after the diagnosis of HIV under long-standing combined antiretroviral therapy and is commonly associated with Kaposi sarcoma.^{19–21} In our series, 40% of the patients also had nodal Kaposi sarcoma, but multicentric Castleman disease presented shortly after primary HIV infection or even at the time of HIV diagnosis with a median of 18 months (0–182 months). This atypical presentation of our HIV-positive multicentric Castleman disease cases may be due to the introduction of combined antiretroviral therapy that has dramatically modified the natural history of HIV infection. Except for the clinical presentation, all our cases fulfilled the criteria for multicentric Castleman disease.

Peculiarly we found five multicentric Castleman disease cases and one additional case with HHV8-related reactive lymphoid hyperplasia with cytoplasmic staining for the latent nuclear antigen of HHV8 (LANA1) in follicular dendritic cells. This finding has already been recognized in the literature.²² Dendritic cells play an important role in HHV8 infection and pathogenesis.^{23,24} Myeloid-dendritic cells and macrophages can be infected by HHV8 through DC-SIGN receptor²⁵ and follicular dendritic-like cells have shown to express DC-SIGN.²⁶

Table 6 Main features of published GLPD cases

Source	Clinical features				Immunophenotype				Molecular	
	Gender, age	IS	Presentation	Treatment	Outcome, follow-up	B-cell markers	IRF4 K/L	EBV/HHV8		
Du'02	41, M	No	Axillary, cervical LN for 6 years	CHOP	Aw/oD, 7 years	CD20 – CD79a –	ND	L	+/+	Dominant band
Du'02	61, M	No	Submandibular, inguinal LN for 4 years	RT	Aw/oD, 15 years	CD20 – CD79a –	ND	L	+/+	NA
Du'02	63, F	No	Left inguinal & para aortic		Unknown	CD20 – CD79a – CD138 – CD38+	ND	K	+/+	Polyclonal
Seliem'07	45, M	HIV	Generalized LN, effusion, leukemic, SMC, B symptoms	Prednisone ATB Cyclofosfamide	DwD	CD20 focal	+	L	+/+	Polyclonal
D'Antonio and'11	60, M	No	Laterocervical LN, B symptoms	No	Aw/oD, 7 years	CD20 –, CD79a – CD138 –	+	K	+/+	Polyclonal
Oh'11	75, M	COPD	Submandibular LN	CHOP	Aw/oD, 19 m	CD20 –, CD138+		K	+/+	Polyclonal
Courville'14	63, F	HCV, HBV	Isolated Mesenteric LN Hemolytic anemia		Progression to EBV +/HHV8+lymphoma Aw/oD, 13 m (8 m after initial diagnosis)	CD20 –, CD79a – PAX5 –, CD138 –	+	L	+/+	
Papoudou-Bai'15	53, M	No	Cervical, supraclavicular LN	Unknown	Unknown	CD79a –, CD38 – CD138 –	+		+/+	

Abbreviations: COPD, chronic obstructive pulmonary disease; HBC, hepatitis B virus; HCV, hepatitis C virus; IS, immunosuppression.

However, we do not know whether this pattern of staining is specific.

Interestingly, we also identified three atypical multicentric Castleman disease cases that were enriched in the number of plasmablasts. All these cases had a massive proliferation of plasmablasts in the follicles with a highly disrupted follicular dendritic cell meshwork. Only with staining of residual IgD-positive mantle zone cells the follicles became apparent. The differential diagnosis with HHV8-positive germinotropic lymphoproliferative disorder could be challenging. Nevertheless, in germinotropic lymphoproliferative disorder the follicles are easily identified on H&E stain and the lesions are usually EBV+. One of our plasmablast-rich multicentric Castleman disease exhibited large aggregates of HHV8-positive plasmablasts reminiscent of what have been described as microlymphoma.²¹ None of our cases progressed to overt HHV8-associated lymphoma. The differential diagnosis with primary effusion lymphoma could be considered in some of these cases as they may present with effusions with HHV8-infected plasmablasts. However, contrary to primary effusion lymphoma the number of HHV8 cells present in the effusion of these cases is very low and within a reactive background of plasma cells and small lymphocytes.

HHV8-positive germinotropic lymphoproliferative disorder is a non aggressive HHV8-positive lesion that occurs in HIV-negative patients usually with localized disease.^{7,8} Interestingly, some of our cases differ from this particular clinical presentation. Three of our five patients were HIV positive and presented with generalized lymphadenopathy and B symptoms. Since the original description, just eight more cases have been reported (Table 6) and only one of them arose in an HIV-positive patient with a more aggressive clinical course. Histologically, the plasmablastic proliferation in these cases spread outside the germinal center invading the outer zone. Unlike microlymphoma arising in multicentric Castleman disease, our cases involve most of the follicles and the disruption of the follicular dendritic cells is not limited to a single follicle. Moreover, microlymphoma is an EBV unrelated proliferation and the neoplastic cells are always lambda restricted, whereas two of our cases are kappa restricted. Intriguingly, we observed a similar pattern in a partially preserved lymph node of an HIV-positive patient with HHV8-positive large cell lymphoma, suggesting the possibility of a germinotropic lymphoproliferative disorder transformation into an overt lymphoma as previously suggested.^{9,10} Our HIV-negative patients presented with conventional clinical and pathological germinotropic lymphoproliferative disorder features but one of them was EBV negative, an aspect not previously described in this entity. This case did not fulfill the criteria of multicentric Castleman disease, since the patient had localized lymph node enlargement without B

symptoms and morphologically the follicles were expanded, filled with plasmablasts and the cells expressed kappa light chain. Similarly to other HHV8-related proliferations^{27,28} but not previously reported in germinotropic lymphoproliferative disorder, three of our five cases aberrantly expressed CD3.

Among HHV8-positive lymphomas we have identified 14 primary effusion lymphoma cases with typical features and three additional cases with some particularities. One HIV patient had a primary effusion lymphoma with a primary cerebrospinal fluid involvement with no effusions or lymph node enlargement. Primary central nervous system involvement by primary effusion lymphoma has been rarely described in HIV-positive patients.^{29,30} Detection of HHV8-positive plasmablasts in the cerebrospinal fluid is the diagnostic feature. One patient had a disseminated HHV8-positive lymphoma presented with lesions reminiscent of germinotropic lymphoproliferative disorder in a partially preserved lymph node. Although we cannot rule out a secondary involvement of the follicles by the tumor, this observation has been rarely recognized,^{9,10} suggesting that some cases of germinotropic lymphoproliferative disorder may progress to overt lymphoma. Finally, we also found an EBV negative, HHV8-positive, large cell lymphoma expressing IgM lambda, limited to the spleen in a non-HIV patient. This situation was similarly described in an HIV-positive patient³¹ and may correspond to the new World Health Organization category of HHV8-positive diffuse large B-cell lymphoma, not otherwise specified.⁸

In summary, HHV8-positive lymphoid proliferations are a heterogeneous group of lymphoid proliferations that represent a wide pathological spectrum ranging from reactive hyperplasia to aggressive lymphomas. The results of our study advocate for routine HHV8 testing in all lymphoid proliferations in immunosuppressed patients, especially in the setting of HIV infection.

Acknowledgments

We owe an enormous amount of gratitude to all of the consultant hematologists and pathologists who provided patient samples for this study. AM is supported by Fondo de Investigación Sanitaria (PI14/00333) and FEDER *One way to Europe*. EC research is supported by the Ministerio de Economía y Competitividad, Grant No. SAF2015-64885-R and Instituto de Salud Carlos III, Red Temática de Investigación Cooperativa en Cáncer (RTICC) grant RD12/0036/0036 and the European Regional Development Fund 'Una manera de fer Europa'. EC is an Academia Researcher of the 'Institució Catalana de Recerca i Estudis Avançats' (ICREA) of the Generalitat de Catalunya.

Disclosure/conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Chang Y, Cesarman E, Pessin MS, *et al*. Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Science* 1994;266:1865–1869.
- Cesarman E, Chang Y, Moore PS *et al*. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-related body-cavity-based lymphomas. *N Engl J Med* 1995;332:1186–1191.
- Chadburn A, Hyjek E, Mathew S, *et al*. KSHV-positive solid lymphomas represent an extra-cavitary variant of primary effusion lymphoma. *Am J Surg Pathol* 2004;28:1401–1416.
- Soulier J, Grollet L, Oksenhendler E, *et al*. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-like DNA sequences in multicentric Castlemans disease. *Blood* 1995;86:1276–1280.
- Oksenhendler E, Duarte M, Soulier J, *et al*. Multicentric Castlemans disease in HIV infection: a clinical and pathological study of 20 patients. *AIDS* 1996;10:61–67.
- Ariza-Heredia EJ, Razonable RR. Human herpes virus 8 in solid organ transplantation. *Transplantation* 2011;92:837–844.
- Du MQ, Diss TC, Liu H, *et al*. KSHV- and EBV-associated germinotropic lymphoproliferative disorder. *Blood* 2002;100:3415–3418.
- Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, *et al*. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood* 2016;127:2375–2390.
- Seliem RM, Griffith RC, Harris NL, *et al*. HHV-8+, EBV+ multicentric plasmablastic microlymphoma in an HIV+ man: the spectrum of HHV-8+ lymphoproliferative disorders expands. *Am J Surg Pathol* 2007;31:1439–1445.
- Courville EL, Sohani AR, Hasserjian RP, *et al*. Diverse clinicopathologic features in human herpesvirus 8-associated lymphomas lead to diagnostic problems. *Am J Clin Pathol* 2014;142:816–829.
- Dojcinov SD, Venkataraman G, Pittaluga S, *et al*. Age-related EBV-associated lymphoproliferative disorders in the Western population: a spectrum of reactive lymphoid hyperplasia and lymphoma. *Blood* 2011;117:4726–4735.
- Garcia-Herrera A, Song JY, Chuang SS, *et al*. Non-hepatosplenic gammadelta T-cell lymphomas represent a spectrum of aggressive cytotoxic T-cell lymphomas with a mainly extranodal presentation. *Am J Surg Pathol* 2011;35:1214–1225.
- van Dongen JJ, Langerak AW, Bruggemann M, *et al*. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia* 2003;17:2257–2317.
- Cheson BD, Pfistner B, Juweid ME, *et al*. Revised response criteria for malignant lymphoma. *J Clin Oncol* 2007;25:579–586.
- Gonzalez-Farre B, Rovira J, Martinez D, *et al*. In vivo intratumoral Epstein-Barr virus replication is associated with XBP1 activation and early-onset post-transplant lymphoproliferative disorders with prognostic implications. *Mod Pathol* 2014;27:1599–1611.
- Polizzotto MN, Uldrick TS, Hu D, *et al*. Clinical manifestations of Kaposi sarcoma herpesvirus lytic activation: multicentric Castlemans disease (KSHV-MCD) and the KSHV inflammatory cytokine syndrome. *Front Microbiol* 2012;3:73.
- Polizzotto MN, Uldrick TS, Wyvill KM, *et al*. Clinical features and outcomes of patients with symptomatic Kaposi sarcoma herpesvirus (KSHV)-associated inflammation: prospective characterization of KSHV inflammatory cytokine syndrome (KICS). *Clin Infect Dis* 2016;62:730–738.
- Hasegawa H, Katano H, Tanno M, *et al*. BCL-6-positive human herpesvirus 8-associated solid lymphoma arising from liver and spleen as multiple nodular lesions. *Leuk Lymphoma* 2004;45:2169–2172.
- Dupin N, Diss TL, Kellam P, *et al*. HHV-8 is associated with a plasmablastic variant of Castlemans disease that is linked to HHV-8-positive plasmablastic lymphoma. *Blood* 2000;95:1406–1412.
- Oksenhendler E, Boulanger E, Galicier L, *et al*. High incidence of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus-related non-Hodgkin lymphoma in patients with HIV infection and multicentric Castlemans disease. *Blood* 2002;99:2331–2336.
- Schulte KM, Talat N. Castlemans disease—a two compartment model of HHV8 infection. *Nat Rev Clin Oncol* 2010;7:533–543.
- El Daly H, Bower M, Naresh KN. Follicular dendritic cells in multicentric Castlemans disease present human herpes virus type 8 (HHV8)-latent nuclear antigen 1 (LANA1) in a proportion of cases and is associated with an enhanced T-cell response. *Eur J Haematol* 2010;84:133–136.
- Campbell DM, Rappocciolo G, Jenkins FJ, *et al*. Dendritic cells: key players in human herpesvirus 8 infection and pathogenesis. *Front Microbiol* 2014;5:452.
- Hensler HR, Rappocciolo G, Rinaldo CR, *et al*. Cytokine production by human herpesvirus 8-infected dendritic cells. *J Gen Virol* 2009;90:79–83.
- Rappocciolo G, Jenkins FJ, Hensler HR, *et al*. DC-SIGN is a receptor for human herpesvirus 8 on dendritic cells and macrophages. *J Immunol* 2006;176:1741–1749.
- Taruishi M, Terashima K, Dewan Z, *et al*. Role of follicular dendritic cells in the early HIV-1 infection: in vitro model without specific antibody. *Microbiol Immunol* 2004;48:693–702.
- Beatty MW, Kumar S, Sorbara L, *et al*. A biophenotypic human herpesvirus 8-associated primary bowel lymphoma. *Am J Surg Pathol* 1999;23:992–994.
- Said JW, Shintaku IP, Asou H, *et al*. Herpesvirus 8 inclusions in primary effusion lymphoma: report of a unique case with T-cell phenotype. *Arch Pathol Lab Med* 1999;123:257–260.
- Ely SA, Powers J, Lewis D, *et al*. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-positive primary effusion lymphoma arising in the subarachnoid space. *Hum Pathol* 1999;30:981–984.
- Jain S, Palekar A, Monaco SE, *et al*. Human immunodeficiency virus-associated primary effusion lymphoma: an exceedingly rare entity in cerebrospinal fluid. *Cytojournal* 2015;12:22.
- Engels EA, Pittaluga S, Whitby D, *et al*. Immunoblastic lymphoma in persons with AIDS-associated Kaposi's sarcoma: a role for Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Mod Pathol* 2003;16:424–429.

DISCUSIÓN

Los trabajos que integran esta tesis están centrados en dos grupos de síndromes linfoproliferativos asociados a inmunodeficiencia, los síndromes linfoproliferativos post-trasplante y las proliferaciones linfoides asociadas al virus herpes tipo 8. La etiopatogenia de estas lesiones es poco conocida, debido a la gran heterogeneidad clínica e histológica que presentan. Además, su baja incidencia y el solapamiento clínico e histológico dificultan el establecimiento de criterios diagnósticos específicos y factores con implicaciones pronósticas. El manejo clínico de estas lesiones es también problemático ya que se desarrollan en pacientes con un sistema inmunológico defectuoso de manera que encontrar el equilibrio entre el restablecimiento de la inmunidad y el tratamiento de la lesión en sí puede resultar un reto para el médico que trata al paciente.

Así, en el primer trabajo nos centramos en los síndromes linfoproliferativos post-trasplante y en la identificación de pacientes de riesgo que potencialmente se podrían beneficiar de tratamientos con menor toxicidad. En el segundo trabajo, caracterizamos una serie larga de proliferaciones linfoides asociadas a la infección por virus herpes tipo 8 y aportamos criterios histológicos que permiten una mejor clasificación.

En el **primer trabajo** de esta tesis analizamos una serie amplia de PTLD en la que estudiamos de manera extensa la función del EBV y sugerimos el papel de la replicación viral en tejidos en estos trastornos. El EBV tiene una implicación fundamental en el desarrollo de los PTLD ya que en la mayoría de los casos existen células tumorales infectadas por el virus.⁽²⁰⁵⁾ Además, la seronegatividad para EBV en el momento del trasplante es uno de los principales factores de riesgo para su desarrollo. Este factor explica la mayor incidencia de PTLD en niños relacionado probablemente con la primoinfección viral.⁽²⁰⁶⁻²⁰⁸⁾ De hecho, el tratamiento profiláctico con antivirales en pacientes pediátricos se ha relacionado con una tasa menor de PTLD.⁽²⁰⁹⁻²¹¹⁾ Clásicamente se pensaba que la replicación viral se daba únicamente en dos supuestos, durante la primoinfección y en el momento de la reactivación en pacientes HIV positivos con leucoplasia oral vellosa.⁽²¹²⁾ Sin embargo, modelos murinos

han demostrado la importancia de la fase lítica también en la linfomagénesis.^(114,213) Los ratones infectados con cepas de EBV con capacidad replicativa desarrollan más linfomas que los animales infectados con cepas sin capacidad de replicación.⁽¹¹⁴⁾

Mediante técnicas de inmunohistoquímica analizamos la presencia de replicación viral en muestras de PTLD mediante el estudio de 2 genes implicados en el inicio de la fase lítica del virus, BZLF1 y BMRF1. Estos genes se expresaron en el 60% de los PTLD-EBV positivos de nuestra serie y de manera similar a los modelos murinos solamente detectamos replicación en una pequeña fracción de células neoplásicas, que parece pueda ser suficiente para desempeñar un papel en la linfomagénesis. El escaso número de células en fase lítica puede deberse a que en algunos casos la infección viral es citocida y puede sensibilizar las células del huésped para ser eliminadas por células NK.⁽²¹⁴⁻²¹⁶⁾ Sin embargo, aunque en algunos casos el origen de las partículas virales estuviese en células no neoplásicas, la mera presencia de éstas podría generar un microambiente que permitiría el crecimiento del tumor. La expresión de algunos genes de fase lítica como BZLF1 induce la secreción de IL-10 por parte de las células B que promueve la supervivencia tanto de la población de las células B tumorales como de células no neoplásicas. Además, las células infectadas pueden lisarse y de esta manera permitir la propagación horizontal del virus de célula a célula con el consiguiente aumento del pool de células latentemente infectadas con genes virales oncogénicamente activos.⁽¹¹⁴⁾ Por otra parte, la replicación viral puede ser también muy importante desde un punto de vista biológico, ya que dos de los genes tempranos de fase lítica BHRF1 y BALF1 son homólogos de BCL2 y promueven la supervivencia tumoral.^(112,113)

También estudiamos mediante inmunohistoquímica la expresión de XBP1, un factor de transcripción relacionado con la diferenciación plasmocelular cuya expresión se ha asociado a un comportamiento clínico más agresivo en otros tipos de linfomas⁽¹⁹⁵⁾ y que además promueve la expresión de BZLF1.^(197,198,217) Además, otros factores de transcripción que inhiben la diferenciación plasmocelular, inhiben también la replicación viral, lo que sugiere que aquellos tumores con mayor diferenciación

plasmocelular podrían ser los que presentaran mayores tasas de replicación viral.^(199,200) En nuestra serie completa de pacientes, un 37.5% de nuestros casos mostraban expresión de XBP1 pero si nos centrábamos solamente en los casos EBV positivos existía una correlación importante entre replicación viral y diferenciación plasmocelular (11/12 con replicación vs 4/11 sin replicación; $p < 0.005$) lo que apoya una conexión importante entre estos eventos. Además, de manera similar a otros tipos de linfomas⁽¹⁹⁵⁾ la expresión de XBP1 se asociaba a agresividad clínica, con una supervivencia global al año del diagnóstico del 33% en los casos XBP1 positivos vs 87% en los negativos ($p = 0.002$).

La latencia es el estado en que el virus permanece en la célula infectada sin producción viral activa. Durante esta fase, a diferencia de la fase replicativa, solamente existe expresión de un número limitado de genes. La fase de latencia tipo III es aquella en la que se expresan todos los genes de latencia y es la fase típicamente asociada a la mononucleosis infecciosa o a los estados de inmunodeficiencia.⁽²¹⁸⁾ Sin embargo, en nuestra serie solamente 46% de los casos EBV positivos mostraban latencia tipo III, probablemente debido a la reducción de la intensidad en los tratamientos inmunosupresores tras el trasplante y a la represión de EBNA durante la diferenciación plasmocelular.^(198,219,220)

La activación de la fase lítica es el paso clave para la transmisión del EBV de célula a célula, dado que al activarse la fase lítica, la nueva célula infectada expresa el programa de latencia tipo III y se diferencia hacia una célula B de memoria. Ésta, es liberada finalmente a la sangre periférica lo que permite detectar niveles séricos altos del virus. Por eso, algunos autores han empleado la PCR en suero para evaluar la replicación viral.^(128,221) En nuestra serie sin embargo, existía poca correlación entre los datos de PCR en sangre y la replicación viral en los tejidos analizados al igual que sucede con otros virus que replican también en tejidos.⁽²²²⁾ En la fase de latencia la replicación del episoma se da por la vía de la DNA polimerasa del huésped de manera que no es sensible a los antivirales, que para actuar requieren la DNA polimerasa viral. Por este motivo, antes de decidir un tratamiento con antivirales en los pacientes con

PTLD debería realizarse una evaluación de replicación,^(111,223,224) y así seleccionar aquellos pacientes que se podrían beneficiar de un tratamiento antiviral. El uso de antivirales como tratamiento profiláctico para la prevención de desarrollo de PTLD se ha utilizado con éxito en pacientes pediátricos.⁽²¹¹⁾ Sin embargo, en adultos los resultados son más discutidos, probablemente debido a que la mayoría de los adultos ya están infectados en el momento del trasplante y además en muchos casos, no hay un protocolo estandarizado para estudiar el estatus del EBV tanto en el receptor como en el donante.^(210,225,226)

Aunque el tratamiento de elección para los PTLD es la reducción de la inmunosupresión, que produce buenos resultados en lesiones tempranas y en PTLD polimórficos, en muchos casos, especialmente en las lesiones monomórficas, se requieren tratamientos adicionales. De hecho, actualmente las guías de tratamiento recomiendan reducir la inmunosupresión y en pacientes que no responden usar como primera línea un tratamiento secuencial con rituximab y CHOP (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisona).^(15,227) Curiosamente tanto rituximab como los esteroides y algunos agentes quimioterápicos han demostrado ser inductores de la replicación viral *in vitro* y así hacen que las células sean sensibles a los agentes antivirales.^(45,223) Por otro lado, bortezomib es un inhibidor del proteosoma que interfiere en la activación de XBP1 y también induce replicación viral de las células infectadas. Este fármaco se encuentra actualmente en estudio en ensayos clínicos de neoplasias asociadas a gamma herpes virus, como los PTLD.⁽²²⁸⁻²³⁰⁾

En nuestra serie, la combinación de latencia tipo III con replicación simultánea parecía detectar un subgrupo de pacientes altamente inmunosuprimidos con menor incidencia de rechazo o enfermedad del injerto contra el huésped y mayor riesgo de reactivación de citomegalovirus. Estos pacientes, tenían además una supervivencia menor y un tiempo desde el trasplante hasta el debut del PTLD también menor. Aunque esto podría deberse a que son pacientes más inmunodeprimidos pensamos que la replicación viral tiene un valor importante en esta agresividad. De manera que si reducimos los niveles de inmunosupresión de estos pacientes y los tratamos con

terapias dirigidas a combatir la replicación viral (antivirales) podríamos eliminar las células en fase lítica y así evitar la transmisión de EBV de célula a célula.

En el **segundo trabajo** de esta tesis nos centramos en las proliferaciones linfoides asociadas a HHV8. Del mismo modo que ocurre con EBV⁽²³¹⁾ tras la primoinfección, el virus establece una fase de latencia donde permanece de forma silente hasta el momento de la reactivación. Las proliferaciones asociadas a infección por HHV8 están menos caracterizadas que las asociadas a EBV, en parte debido a su baja frecuencia y al solapamiento clínico e histológico que presentan, lo que dificulta su adecuada clasificación. En este trabajo estudiamos 66 casos de proliferaciones linfoides, 77% en el contexto de infección por HIV y aportamos criterios que permiten una mejor clasificación. También identificamos hallazgos previamente no descritos que sugieren un espectro más amplio de proliferaciones asociadas a HHV8 de lo previamente reconocido.

Describimos 13 casos de hiperplasias linfoides reactivas (HHV8-RH), todas en el contexto de infección por HIV y presencia de escasas células HHV8 positivas. Este hallazgo ampliamente conocido para EBV, no está bien caracterizado para HHV8 y puede conducir a un diagnóstico erróneo de MCD con el sobretratamiento que esto implica. Todos los pacientes de este grupo sin lesiones sobreañadidas presentaron evoluciones favorables con tratamiento antirretroviral. Un paciente recibió tratamiento quimioterápico debido a un diagnóstico inicial erróneo de MCD. La presentación clínica de estos pacientes puede ser heterogénea y aparentemente agresiva con linfadenopatías generalizadas y síntomas inflamatorios sistémicos que remedan un linfoma o MCD. Recientemente se ha descrito un síndrome conocido como KICS que clínicamente se presenta de forma similar. Sin embargo, su sustrato histológico no está bien caracterizado.^(232,233) Estas lesiones se caracterizan por niveles séricos elevados de IL-6. Es posible que algunos de nuestros casos puedan corresponder a casos de KICS pero no disponemos de los niveles séricos de IL-6 para poder confirmarlo. Por otra parte, aunque ninguno de nuestros casos presentaba aspectos de MCD, las biopsias concomitantes o posteriores en 3 pacientes

evidenciaron MCD lo que sugiere que, de manera análoga a EBV, estas lesiones se pueden presentar en un mismo paciente o pueden transformarse en otras lesiones. Este hallazgo muestra la importancia de rebiopsiar a los pacientes siempre que los síntomas clínicos persistan. Discernir si las células infectadas por HHV8 en estos casos eran células circulantes o representaban un estadio inicial de MCD es difícil debido al escaso número de casos. Uno de los pacientes que desarrolla MCD al cabo de 2 meses con cART ya tenía células infectadas en los mantos foliculares. Sin embargo, este patrón fue poco frecuente en nuestros casos y en la mayoría de muestras se trataba de células interfoliculares dispersas y sin progresión posterior a MCD.

Nuestro estudio también identificó una lesión no descrita en la literatura. Se trataba de 2 casos de proliferaciones plasmablasticas limitadas al bazo que afectaban preferentemente la pulpa roja en pacientes intensamente inmunodeprimidos. Estos casos no cumplían criterios de linfomas asociados al HHV8 con presentación exclusiva esplénica ni de otras proliferaciones conocidas asociadas a HHV8. Aunque el número de casos es muy limitado para obtener conclusiones robustas la lesión parecía tener un comportamiento relativamente indolente. En uno de los pacientes fue un hallazgo casual en una autopsia por sarcoma de Kaposi diseminado con infecciones oportunistas sobreañadidas y en el otro caso, fue descubierto en la esplenectomía y presentó una evolución satisfactoria al tratamiento con inmunoterapia.

La lesión más frecuente en nuestra serie fue la MCD. Describimos 28 casos, el 75% en contexto de HIV y aportamos hallazgos inusuales tanto desde el punto de vista clínico como patológico. Clásicamente la enfermedad se desarrolla en pacientes con HIV de larga evolución.^(169,171,234) En nuestra serie, por el contrario, 40% de los pacientes se presentaron poco tiempo después de la primoinfección o incluso en el momento del diagnóstico. Esto podría deberse al tratamiento con antirretrovirales que han modificado el curso clínico de la enfermedad. Curiosamente, identificamos 5 casos de MCD y un caso de HHV8-RH con tinción citoplasmática para el antígeno de latencia nuclear de HHV8 (LANA1) en células foliculares dendríticas (FDC). Este hallazgo, ya se ha descrito previamente en la literatura.⁽²³⁵⁾ Las células dendríticas juegan un papel

muy importante en la infección por HHV8 y en su patogénesis.^(236,237) Las células progenitoras mieloides, de las que se originarán las células dendríticas, y los macrófagos pueden ser infectados por HHV8 a través del receptor DC-SIGN,⁽²³⁸⁾ gen que se expresa en células tipo FDC.⁽²³⁹⁾ Sin embargo, no sabemos si se trata de un patrón específico o no, ya que no realizamos pruebas de especificidad.

En la revisión de nuestra serie identificamos tres casos difíciles de clasificar desde el punto de vista histológico. Les llamamos MCD rico en plasmablastos (PBR-MCD) ya que presentaban un gran número de plasmablastos HHV8 positivos que planteaban el diagnóstico diferencial con otras entidades como el GLPD o incluso un microlinfoma originado sobre una MCD.⁽²³⁴⁾ Estos tres casos eran EBV negativos y presentaban folículos muy distorsionados con pérdida de la trama de células foliculares dendríticas. Además, no existía crecimiento extrafolicular de las células neoplásicas con borramiento de la arquitectura. Un aspecto que hay tener en cuenta es que pueden presentarse con derrames con células HHV8 positivas que sugerirían el diagnóstico de linfoma primario de cavidades. Sin embargo, en estos casos el número de células era mucho menor, éstas crecían en un fondo mixto linfoplasmocitario y no eran tan atípicas como en el linfoma.

Los síndromes linfoproliferativos germinotrópicos (GLPD) son un grupo de lesiones poco agresivas que se desarrollan en pacientes HIV negativos y se presentan como enfermedad localizada.^(27,176) Aunque existen pocos casos descritos en la literatura, los casos publicados son típicamente proliferaciones limitadas a los centros germinales con morfología y fenotipo plasmablastico y presentan coinfección de EBV y HHV8. Nosotros describimos 5 casos de GLPD con características particulares. Tres de los pacientes eran HIV positivos y se presentaban con linfadenopatía generalizada y síntomas B. En la literatura existe un caso similar descrito en un paciente HIV con comportamiento clínico más agresivo.⁽¹⁸⁵⁾ Histológicamente estos casos mostraban también signos de mayor agresividad con extensión fuera de los centros germinales pero sin borrar todavía la arquitectura del ganglio. El diagnóstico diferencial se establece principalmente con un microlinfoma. Sin embargo en los GLPD las

proliferaciones afectan principalmente los centros germinales de la mayoría de los folículos a diferencia de los microlinfomas en los que la proliferación neoplásica se acostumbra a desarrollar a partir del crecimiento extrafolicular de uno de los folículos. Además los microlinfomas son proliferaciones EBV negativas y siempre tienen restricción de cadena ligera lambda mientras que dos de los casos de nuestra serie presentaban restricción de cadena ligera kappa. Curiosamente, observamos un patrón similar en uno de los ganglios de un paciente HIV positivo con un linfoma manifiesto lo que sugirió la posible transformación de los GLPD como otros autores ya han mencionado.^(180,185) Los pacientes HIV negativos con GLPD de nuestra serie clínicamente se presentaron de manera convencional. Sin embargo uno de los casos fue negativo para la hibridación *in situ* de EBV, un hallazgo no descrito previamente en la literatura. Este caso no correspondía a una MCD ya que los centros germinales estaban repletos de células plasmablasticas que mostraban modulación de marcadores B y a diferencia también de la MCD exhibían restricción de cadena ligera kappa. De manera similar a otras proliferaciones linfoides relacionadas con HHV8,^(173,240) tres de los cinco casos de nuestra serie tenían expresión aberrante de CD3. Este hallazgo ha sido recientemente reportado en tres casos adicionales.^(178,179)

Por último, dentro del grupo de los linfomas describimos 14 casos de PEL de presentación y fenotipo típicos y 3 casos con algunas particularidades. Un paciente con PEL se presentó con afectación selectiva del sistema nervioso central sin derrames ni linfadenopatías. Esta presentación, aunque está descrita en pacientes HIV positivos, es muy inusual.^(241,242) Los otros dos casos no cumplían criterios de PEL. Un paciente tenía un linfoma HHV8 positivo diseminado con lesiones que remedaban a un GLPD en uno de los ganglios de la autopsia. Este hallazgo se ha observado previamente y sugiere que en algunos casos los GLPD pueden evolucionar a linfomas^(180,185) aunque no podemos descartar que se tratara de una afectación secundaria de los folículos por el linfoma. Finalmente, también reportamos un caso de linfoma de células grandes HHV8 positivo, EBV negativo con expresión de IgM lambda, limitado al bazo en un paciente HIV negativo.⁽¹⁷⁰⁾ Esta situación está descrita en un paciente HIV positivo y podría corresponder a la nueva entidad de la WHO de DLBCL HHV8 positivo, NOS.⁽²⁷⁾

En resumen, las proliferaciones linfoides asociadas al HHV8 son un grupo heterogéneo de lesiones que representan un amplio espectro de casos que van desde hiperplasias reactivas hasta verdaderos linfomas. Los resultados de este estudio sugirieron que se debe proceder al estudio de rutina de HHV8 en todas las proliferaciones linfoides en pacientes inmunosuprimidos, especialmente en el contexto de HIV.

CONCLUSIONES

- 1.- El virus de Epstein-Barr expresa genes de fase lítica en los tejidos afectados por síndromes linfoproliferativos post-trasplante de forma similar a lo observado en modelos murinos.
- 2.- La replicación viral se asocia a un desarrollo temprano de los síndromes linfoproliferativos post-trasplante y es independiente del tipo de régimen de inmunosupresión usado o del tipo de trasplante recibido.
- 3.- La expresión conjunta de proteínas de latencia tipo III y replicación viral mediante técnicas de inmunohistoquímica, fácilmente aplicables a la rutina diagnóstica, reconoce pacientes muy inmunodeprimidos que se podrían beneficiar de terapia antiviral o de una mayor reducción de la inmunosupresión.
- 4.- En PTLD humanos, como se observa *in vitro*, existe también una asociación significativa entre diferenciación plasmocelular y replicación viral.
- 5.- En los síndromes linfoproliferativos post-trasplante la expresión de XBP1 se asocia a un peor pronóstico con menor supervivencia global.
6. Los síndromes linfoproliferativos asociados a HHV8 son un grupo heterogéneo de lesiones que conforman un espectro que incluye cinco grupos de lesiones que van desde proliferaciones reactivas hasta linfomas agresivos que pueden tener presentaciones atípicas.
7. Los casos de hiperplasia folicular reactiva asociada a HHV8 pueden presentarse con síntomas sistémicos. Aunque son lesiones con excelente pronóstico en ocasiones pueden transformarse o presentarse de forma concomitante con otras proliferaciones linfoides asociadas a HHV8. Por lo tanto, es importante rebiopsiar a los pacientes siempre que exista persistencia de los síntomas clínicos.

8. Existen casos de proliferaciones linfoides asociadas a HHV8 de localización esplénica y afectación predominante de la pulpa roja. Estas lesiones no se habían reconocido y tienen un comportamiento clínico aparentemente indolente.

9. Hemos reconocido una forma de enfermedad de Castleman multicéntrica con mayor número de plasmablastos que puede debutar con derrames, citopenias y megalias. Aunque no parece tener implicaciones pronósticas es importante su reconocimiento para evitar errores diagnósticos, particularmente no confundirla con linfoma.

10. El síndrome linfoproliferativo germinotrópico tiene un espectro clínico-patológico mayor de lo que se había reconocido. Puede darse en el contexto de pacientes HIV positivos y presentar características clínicas e histológicas más agresivas. No todos los casos se asocian a coinfección por EBV.

BIBLIOGRAFÍA

1. Natkunam Y, Gratzinger D, de Jong D, et al. Immunodeficiency and Dysregulation Report of the 2015 Workshop of the Society for Hematopathology/European Association for Haematopathology. *American Journal of Clinical Pathology* 2017;147:124-8.
2. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. WHO Classification of Tumors of Hematopoietic and Lymphoid Tissues. 4th ed. Lyon, France: IARC Press; 2008.
3. Nasta SD, Carrum GM, Shahab I, Hanania NA, Udden MM. Regression of a plasmablastic lymphoma in a patient with HIV on highly active antiretroviral therapy. *Leuk Lymphoma* 2002;43:423-6.
4. Starzl TE, Nalesnik MA, Porter KA, et al. Reversibility of lymphomas and lymphoproliferative lesions developing under cyclosporin-steroid therapy. *Lancet* 1984;1:583-7.
5. Knowles DM, Cesarman E, Chadburn A, et al. Correlative morphologic and molecular genetic analysis demonstrates three distinct categories of posttransplantation lymphoproliferative disorders. *Blood* 1995;85:552-65.
6. Nalesnik MA, Jaffe R, Starzl TE, et al. The pathology of posttransplant lymphoproliferative disorders occurring in the setting of cyclosporine A-prednisone immunosuppression. *Am J Pathol* 1988;133:173-92.
7. Cockfield SM. Identifying the patient at risk for post-transplant lymphoproliferative disorder. *Transpl Infect Dis* 2001;3:70-8.
8. Dharnidharka VR, Tejani AH, Ho PL, Harmon WE. Post-transplant lymphoproliferative disorder in the United States: young Caucasian males are at highest risk. *Am J Transplant* 2002;2:993-8.
9. Babel N, Vergopoulos A, Trappe RU, et al. Evidence for genetic susceptibility towards development of posttransplant lymphoproliferative disorder in solid organ recipients. *Transplantation* 2007;84:387-91.
10. Lee TC, Savoldo B, Barshes NR, et al. Use of cytokine polymorphisms and Epstein-Barr virus viral load to predict development of post-transplant lymphoproliferative disorder in paediatric liver transplant recipients. *Clin Transplant* 2006;20:389-93.
11. VanBuskirk AM, Malik V, Xia D, Pelletier RP. A gene polymorphism associated with posttransplant lymphoproliferative disorder. *Transplant Proc* 2001;33:1834.
12. Ng IO, Shek TW, Thung SN, et al. Microsatellite analysis in post-transplantation lymphoproliferative disorder to determine donor/recipient origin. *Mod Pathol* 2000;13:1180-5.

13. Nuckols JD, Baron PW, Stenzel TT, et al. The pathology of liver-localized post-transplant lymphoproliferative disease: a report of three cases and a review of the literature. *Am J Surg Pathol* 2000;24:733-41.
14. Nalesnik MA. Clinical and pathological features of post-transplant lymphoproliferative disorders (PTLD). *Springer Semin Immunopathol* 1998;20:325-42.
15. Evens AM, Roy R, Sterrenberg D, et al. Post-transplantation lymphoproliferative disorders: diagnosis, prognosis, and current approaches to therapy. *Curr Oncol Rep* 2010;12:383-94.
16. Djokic M, Le Beau MM, Swinnen LJ, et al. Post-transplant lymphoproliferative disorder subtypes correlate with different recurring chromosomal abnormalities. *Genes Chromosomes Cancer* 2006;45:313-8.
17. Poirel HA, Bernheim A, Schneider A, et al. Characteristic pattern of chromosomal imbalances in posttransplantation lymphoproliferative disorders: correlation with histopathological subcategories and EBV status. *Transplantation* 2005;80:176-84.
18. Natkunam Y, Goodlad JR, Chadburn A, et al. EBV-Positive B-Cell Proliferations of Varied Malignant Potential 2015 SH/EAHP Workshop Report Part 1. *American Journal of Clinical Pathology* 2017;147:129-52.
19. Yoon H, Park S, Ju H, et al. Integrated copy number and gene expression profiling analysis of Epstein-Barr virus-positive diffuse large B-cell lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer* 2015;54:383-96.
20. Rinaldi A, Capello D, Scandurra M, et al. Single nucleotide polymorphism-arrays provide new insights in the pathogenesis of post-transplant diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Haematol* 2010;149:569-77.
21. Lenz G, Wright GW, Emre NC, et al. Molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphoma arise by distinct genetic pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:13520-5.
22. Craig FE, Johnson LR, Harvey SA, et al. Gene expression profiling of Epstein-Barr virus-positive and -negative monomorphic B-cell posttransplant lymphoproliferative disorders. *Diagn Mol Pathol* 2007;16:158-68.
23. Vakiani E, Basso K, Klein U, et al. Genetic and phenotypic analysis of B-cell post-transplant lymphoproliferative disorders provides insights into disease biology. *Hematol Oncol* 2008;26:199-211.
24. Morscio J, Tousseyn T. Recent insights in the pathogenesis of post-transplantation lymphoproliferative disorders. *World J Transplant* 2016;6:505-16.
25. Srinivas SK, Sample JT, Sixbey JW. Spontaneous loss of viral episomes accompanying Epstein-Barr virus reactivation in a Burkitt's lymphoma cell line. *J Infect Dis* 1998;177:1705-9.

26. Kapelushnik J, Ariad S, Benharroch D, et al. Post renal transplantation human herpesvirus 8-associated lymphoproliferative disorder and Kaposi's sarcoma. *Br J Haematol* 2001;113:425-8.
27. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood* 2016;127:2375-90.
28. Vakiani E, Nandula SV, Subramaniam S, et al. Cytogenetic analysis of B-cell posttransplant lymphoproliferations validates the World Health Organization classification and suggests inclusion of florid follicular hyperplasia as a precursor lesion. *Hum Pathol* 2007;38:315-25.
29. Wu TT, Swerdlow SH, Locker J, et al. Recurrent Epstein-Barr virus-associated lesions in organ transplant recipients. *Hum Pathol* 1996;27:157-64.
30. Perry AM, Aoun P, Coulter DW, et al. Early onset, EBV(-) PTLD in pediatric liver-small bowel transplantation recipients: a spectrum of plasma cell neoplasms with favorable prognosis. *Blood* 2013;121:1377-83.
31. Reshef R, Vardhanabhuti S, Luskin MR, et al. Reduction of immunosuppression as initial therapy for posttransplantation lymphoproliferative disorder(bigstar). *Am J Transplant* 2011;11:336-47.
32. Gu Z, Cai B, Yuan L, et al. Successful treatment of polymorphic post-transplant lymphoproliferative disorder after allo-HSCT with reduction of immunosuppression. *Int J Clin Exp Med* 2014;7:1904-9.
33. Al Mansour Z, Nelson BP, Evens AM. Post-transplant lymphoproliferative disease (PTLD): risk factors, diagnosis, and current treatment strategies. *Curr Hematol Malig Rep* 2013;8:173-83.
34. Hatton O, Martinez OM, Esquivel CO. Emerging therapeutic strategies for Epstein-Barr virus+ post-transplant lymphoproliferative disorder. *Pediatr Transplant* 2012;16:220-9.
35. Choquet S, Leblond V, Herbrecht R, et al. Efficacy and safety of rituximab in B-cell post-transplantation lymphoproliferative disorders: results of a prospective multicenter phase 2 study. *Blood* 2006;107:3053-7.
36. Elstrom RL, Andreadis C, Aqui NA, et al. Treatment of PTLD with rituximab or chemotherapy. *Am J Transplant* 2006;6:569-76.
37. Gupta S, Fricker FJ, Gonzalez-Peralta RP, et al. Post-transplant lymphoproliferative disorder in children: recent outcomes and response to dual rituximab/low-dose chemotherapy combination. *Pediatr Transplant* 2010;14:896-902.
38. Styczynski J, Einsele H, Gil L, Ljungman P. Outcome of treatment of Epstein-Barr virus-related post-transplant lymphoproliferative disorder in hematopoietic stem cell recipients: a comprehensive review of reported cases. *Transpl Infect Dis* 2009;11:383-92.

39. Choquet S, Leblond V, Herbrecht R, et al. Efficacy and safety of rituximab in B-cell post-transplantation lymphoproliferative disorders: results of a prospective multicenter phase 2 study. *Blood* 2006;107:3053-7.
40. Bollard CM, Rooney CM, Heslop HE. T-cell therapy in the treatment of post-transplant lymphoproliferative disease. *Nat Rev Clin Oncol* 2012;9:510-9.
41. Heslop HE, Slobod KS, Pule MA, et al. Long-term outcome of EBV-specific T-cell infusions to prevent or treat EBV-related lymphoproliferative disease in transplant recipients. *Blood* 2010;115:925-35.
42. Bollard CM, Gottschalk S, Torrano V, et al. Sustained complete responses in patients with lymphoma receiving autologous cytotoxic T lymphocytes targeting Epstein-Barr virus latent membrane proteins. *J Clin Oncol* 2014;32:798-808.
43. Haque T, Wilkie GM, Jones MM, et al. Allogeneic cytotoxic T-cell therapy for EBV-positive posttransplantation lymphoproliferative disease: results of a phase 2 multicenter clinical trial. *Blood* 2007;110:1123-31.
44. Westphal EM, Mauser A, Swenson J, et al. Induction of lytic Epstein-Barr virus (EBV) infection in EBV-associated malignancies using adenovirus vectors in vitro and in vivo. *Cancer Res* 1999;59:1485-91.
45. Feng WH, Israel B, Raab-Traub N, Busson P, Kenney SC. Chemotherapy induces lytic EBV replication and confers ganciclovir susceptibility to EBV-positive epithelial cell tumors. *Cancer Res* 2002;62:1920-6.
46. Feng WH, Cohen JI, Fischer S, et al. Reactivation of latent Epstein-Barr virus by methotrexate: a potential contributor to methotrexate-associated lymphomas. *J Natl Cancer Inst* 2004;96:1691-702.
47. Perrine SP, Hermine O, Small T, et al. A phase 1/2 trial of arginine butyrate and ganciclovir in patients with Epstein-Barr virus-associated lymphoid malignancies. *Blood* 2007;109:2571-8.
48. Ghosh SK, Perrine SP, Faller DV. Advances in Virus-Directed Therapeutics against Epstein-Barr Virus-Associated Malignancies. *Adv Virol* 2012;2012:509296.
49. Ok CY, Papatomas TG, Medeiros LJ, Young KH. EBV-positive diffuse large B-cell lymphoma of the elderly. *Blood* 2013;122:328-40.
50. Green MR, Rodig S, Juszczynski P, et al. Constitutive AP-1 activity and EBV infection induce PD-L1 in Hodgkin lymphomas and posttransplant lymphoproliferative disorders: implications for targeted therapy. *Clin Cancer Res* 2012;18:1611-8.
51. Tie Y, Ma X, Zhu C, et al. Safety and efficacy of nivolumab in the treatment of cancers: A meta-analysis of 27 prospective clinical trials. *Int J Cancer* 2017;140:948-58.

52. Ansell SM. Nivolumab in the Treatment of Hodgkin Lymphoma. *Clin Cancer Res* 2016;clincanres.
53. Bi XW, Wang H, Zhang WW, et al. PD-L1 is upregulated by EBV-driven LMP1 through NF-kappaB pathway and correlates with poor prognosis in natural killer/T-cell lymphoma. *J Hematol Oncol* 2016;9:109.
54. Carbone A, Vaccher E, Gloghini A, et al. Diagnosis and management of lymphomas and other cancers in HIV-infected patients. *Nat Rev Clin Oncol* 2014;11:223-38.
55. Vandenhende MA, Roussillon C, Henard S, et al. Cancer-Related Causes of Death among HIV-Infected Patients in France in 2010: Evolution since 2000. *PLoS One* 2015;10:e0129550.
56. Simard EP, Pfeiffer RM, Engels EA. Cumulative incidence of cancer among individuals with acquired immunodeficiency syndrome in the United States. *Cancer* 2011;117:1089-96.
57. Shiels MS, Pfeiffer RM, Gail MH, et al. Cancer burden in the HIV-infected population in the United States. *J Natl Cancer Inst* 2011;103:753-62.
58. Lorenzo-Redondo R, Fryer HR, Bedford T, et al. Persistent HIV-1 replication maintains the tissue reservoir during therapy. *Nature* 2016;530:51-6.
59. Connick E, Mattila T, Folkvord JM, et al. CTL fail to accumulate at sites of HIV-1 replication in lymphoid tissue. *J Immunol* 2007;178:6975-83.
60. Kohler SL, Pham MN, Folkvord JM, et al. Germinal Center T Follicular Helper Cells Are Highly Permissive to HIV-1 and Alter Their Phenotype during Virus Replication. *J Immunol* 2016;196:2711-22.
61. Lindqvist M, van Lunzen J, Soghoian DZ, et al. Expansion of HIV-specific T follicular helper cells in chronic HIV infection. *J Clin Invest* 2012;122:3271-80.
62. Totonchy J, Cesarman E. Does persistent HIV replication explain continued lymphoma incidence in the era of effective antiretroviral therapy? *Curr Opin Virol* 2016;20:71-77.
63. Dolcetti R, Giagulli C, He W, et al. Role of HIV-1 matrix protein p17 variants in lymphoma pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015;112:14331-6.
64. Shorrock K, Ellis IO, Finch RG. T-cell lymphoma associated with human immunodeficiency virus (HIV) infection. *Histopathology* 1990;16:189-91.
65. Nasr SA, Brynes RK, Garrison CP, Chan WC. Peripheral T-cell lymphoma in a patient with acquired immune deficiency syndrome. *Cancer* 1988;61:947-51.
66. Lust JA, Banks PM, Hooper WC, et al. T-cell non-Hodgkin lymphoma in human immunodeficiency virus-1-infected individuals. *Am J Hematol* 1989;31:181-7.

67. Castillo J, Perez K, Milani C, Dezube BJ, Pantanowitz L. Peripheral T-cell lymphomas in HIV-infected individuals: a comprehensive review. *J HIV Ther* 2009;14:34-40.
68. Boulanger E, Meignin V, Baia M, et al. Mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma in patients with human immunodeficiency virus infection. *Br J Haematol* 2008;140:470-4.
69. Tirelli U, Vaccher E, Zagonel V, et al. Persistent generalized lymphadenopathy syndrome vs "AIDS"--unrelated malignant lymphoma: comparison of presenting clinical and laboratory findings in 88 patients. AIDS and Related Syndromes Study Group. *Tumori* 1989;75:222-5.
70. Chadburn A, Metroka C, Mouradian J. Progressive lymph node histology and its prognostic value in patients with acquired immunodeficiency syndrome and AIDS-related complex. *Hum Pathol* 1989;20:579-87.
71. Fernandez R, Mouradian J, Metroka C, Davis J. The prognostic value of histopathology in persistent generalized lymphadenopathy in homosexual men. *N Engl J Med* 1983;309:185-6.
72. Delecluse HJ, Anagnostopoulos I, Dallenbach F, et al. Plasmablastic lymphomas of the oral cavity: a new entity associated with the human immunodeficiency virus infection. *Blood* 1997;89:1413-20.
73. Borenstein J, Pezzella F, Gatter KC. Plasmablastic lymphomas may occur as post-transplant lymphoproliferative disorders. *Histopathology* 2007;51:774-7.
74. Castillo JJ, Winer ES, Stachurski D, et al. Clinical and pathological differences between human immunodeficiency virus-positive and human immunodeficiency virus-negative patients with plasmablastic lymphoma. *Leuk Lymphoma* 2010;51:2047-53.
75. Ferrazzo KL, Mesquita RA, Aburad AT, Nunes FD, de Sousa SO. EBV detection in HIV-related oral plasmablastic lymphoma. *Oral Dis* 2007;13:564-9.
76. Valera A, Balague O, Colomo L, et al. IG/MYC rearrangements are the main cytogenetic alteration in plasmablastic lymphomas. *Am J Surg Pathol* 2010;34:1686-94.
77. Taddesse-Heath L, Meloni-Ehrig A, Scheerle J, Kelly JC, Jaffe ES. Plasmablastic lymphoma with MYC translocation: evidence for a common pathway in the generation of plasmablastic features. *Mod Pathol* 2010;23:991-9.
78. Dong HY, Scadden DT, de Leval L, et al. Plasmablastic lymphoma in HIV-positive patients: an aggressive Epstein-Barr virus-associated extramedullary plasmacytic neoplasm. *Am J Surg Pathol* 2005;29:1633-41.
79. Colomo L, Loong F, Rives S, et al. Diffuse large B-cell lymphomas with plasmablastic differentiation represent a heterogeneous group of disease entities. *Am J Surg Pathol* 2004;28:736-47.

80. Castillo JJ, Winer ES, Stachurski D, et al. Clinical and pathological differences between human immunodeficiency virus-positive and human immunodeficiency virus-negative patients with plasmablastic lymphoma. *Leuk Lymphoma* 2010;51:2047-53.
81. Castillo JJ, Bibas M, Miranda RN. The biology and treatment of plasmablastic lymphoma. *Blood* 2015;125:2323-30.
82. Lanoy E, Rosenberg PS, Fily F, et al. HIV-associated Hodgkin lymphoma during the first months on combination antiretroviral therapy. *Blood* 2011;118:44-9.
83. Salloum E, Cooper DL, Howe G, et al. Spontaneous regression of lymphoproliferative disorders in patients treated with methotrexate for rheumatoid arthritis and other rheumatic diseases. *J Clin Oncol* 1996;14:1943-9.
84. Mackey AC, Green L, Liang LC, Dinndorf P, Avigan M. Hepatosplenic T cell lymphoma associated with infliximab use in young patients treated for inflammatory bowel disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2007;44:265-7.
85. Loo EY, Medeiros LJ, Aladily TN, et al. Classical Hodgkin lymphoma arising in the setting of iatrogenic immunodeficiency: a clinicopathologic study of 10 cases. *Am J Surg Pathol* 2013;37:1290-7.
86. Deepak P, Sifuentes H, Sherid M, et al. T-cell non-Hodgkin's lymphomas reported to the FDA AERS with tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) inhibitors: results of the REFURBISH study. *Am J Gastroenterol* 2013;108:99-105.
87. Kotlyar DS, Osterman MT, Diamond RH, et al. A systematic review of factors that contribute to hepatosplenic T-cell lymphoma in patients with inflammatory bowel disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2011;9:36-41.
88. Inui Y, Matsuoka H, Yakushijin K, et al. Methotrexate-associated lymphoproliferative disorders: management by watchful waiting and observation of early lymphocyte recovery after methotrexate withdrawal. *Leuk Lymphoma* 2015;56:3045-51.
89. Oyama T, Ichimura K, Suzuki R, et al. Senile EBV+ B-cell lymphoproliferative disorders: a clinicopathologic study of 22 patients. *Am J Surg Pathol* 2003;27:16-26.
90. Hakim FT, Gress RE. Immunosenescence: deficits in adaptive immunity in the elderly. *Tissue Antigens* 2007;70:179-89.
91. Dojcinov SD, Venkataraman G, Pittaluga S, et al. Age-related EBV-associated lymphoproliferative disorders in the Western population: a spectrum of reactive lymphoid hyperplasia and lymphoma. *Blood* 2011;117:4726-35.
92. Nicolae A, Pittaluga S, Abdullah S, et al. EBV-positive large B-cell lymphomas in young patients: a nodal lymphoma with evidence for a tolerogenic immune environment. *Blood* 2015;126:863-72.

93. Rowe M, Young LS, Crocker J, et al. Epstein-Barr virus (EBV)-associated lymphoproliferative disease in the SCID mouse model: implications for the pathogenesis of EBV-positive lymphomas in man. *J Exp Med* 1991;173:147-58.
94. Mosier DE, Gulizia RJ, Baird SM, et al. Studies of HIV infection and the development of Epstein-Barr virus-related B cell lymphomas following transfer of human lymphocytes to mice with severe combined immunodeficiency. *Curr Top Microbiol Immunol* 1989;152:195-9.:195-9.
95. Kutok JL, Wang F. Spectrum of Epstein-Barr virus-associated diseases. *Annu Rev Pathol* 2006;1:375-404.:375-404.
96. Chang KL, Chen YY, Shibata D, Weiss LM. Description of an in situ hybridization methodology for detection of Epstein-Barr virus RNA in paraffin-embedded tissues, with a survey of normal and neoplastic tissues. *Diagn Mol Pathol* 1992;1:246-55.
97. Iwakiri D, Zhou L, Samanta M, et al. Epstein-Barr virus (EBV)-encoded small RNA is released from EBV-infected cells and activates signaling from Toll-like receptor 3. *J Exp Med* 2009;206:2091-9.
98. Nanbo A, Inoue K, Adachi-Takasawa K, Takada K. Epstein-Barr virus RNA confers resistance to interferon-alpha-induced apoptosis in Burkitt's lymphoma. *EMBO J* 2002;21:954-65.
99. Kirchmaier AL, Sugden B. Dominant-negative inhibitors of EBNA-1 of Epstein-Barr virus. *J Virol* 1997;71:1766-75.
100. Tsimbouri P, Drotar ME, Coy JL, Wilson JB. bcl-xL and RAG genes are induced and the response to IL-2 enhanced in EmuEBNA-1 transgenic mouse lymphocytes. *Oncogene* 2002;21:5182-7.
101. Kohlhof H, Hampel F, Hoffmann R, et al. Notch1, Notch2, and Epstein-Barr virus-encoded nuclear antigen 2 signaling differentially affects proliferation and survival of Epstein-Barr virus-infected B cells. *Blood* 2009;113:5506-15.
102. Mosialos G, Birkenbach M, Yalamanchili R, et al. The Epstein-Barr virus transforming protein LMP1 engages signaling proteins for the tumor necrosis factor receptor family. *Cell* 1995;80:389-99.
103. Henderson S, Rowe M, Gregory C, et al. Induction of bcl-2 expression by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 protects infected B cells from programmed cell death. *Cell* 1991;65:1107-15.
104. Eliopoulos AG, Waites ER, Blake SM, et al. TRAF1 is a critical regulator of JNK signaling by the TRAF-binding domain of the Epstein-Barr virus-encoded latent infection membrane protein 1 but not CD40. *J Virol* 2003;77:1316-28.

105. Everly DN, Jr., Mainou BA, Raab-Traub N. Transcriptional downregulation of p27KIP1 through regulation of E2F function during LMP1-mediated transformation. *J Virol* 2009;83:12671-9.
106. Ohtani N, Brennan P, Gaubatz S, et al. Epstein-Barr virus LMP1 blocks p16INK4a-RB pathway by promoting nuclear export of E2F4/5. *J Cell Biol* 2003;162:173-83.
107. Young LS, Rickinson AB. Epstein-Barr virus: 40 years on. *Nat Rev Cancer* 2004;4:757-68.
108. Merchant M, Caldwell RG, Longnecker R. The LMP2A ITAM is essential for providing B cells with development and survival signals in vivo. *J Virol* 2000;74:9115-24.
109. Portis T, Longnecker R. Epstein-Barr virus (EBV) LMP2A mediates B-lymphocyte survival through constitutive activation of the Ras/PI3K/Akt pathway. *Oncogene* 2004;23:8619-28.
110. Heslop HE. How I treat EBV lymphoproliferation. *Blood* 2009;114:4002-8.
111. Odumade OA, Hogquist KA, Balfour HH, Jr. Progress and problems in understanding and managing primary Epstein-Barr virus infections. *Clin Microbiol Rev* 2011;24:193-209.
112. Altmann M, Hammerschmidt W. Epstein-Barr virus provides a new paradigm: a requirement for the immediate inhibition of apoptosis. *PLoS Biol* 2005;3:e404.
113. Marshall WL, Yim C, Gustafson E, et al. Epstein-Barr virus encodes a novel homolog of the bcl-2 oncogene that inhibits apoptosis and associates with Bax and Bak. *J Virol* 1999;73:5181-5.
114. Ma SD, Hegde S, Young KH, et al. A new model of Epstein-Barr virus infection reveals an important role for early lytic viral protein expression in the development of lymphomas. *J Virol* 2011;85:165-77.
115. Baumforth KR, Young LS, Flavell KJ, Constandinou C, Murray PG. The Epstein-Barr virus and its association with human cancers. *Mol Pathol* 1999;52:307-22.
116. Young LS, Yao QY, Rooney CM, et al. New type B isolates of Epstein-Barr virus from Burkitt's lymphoma and from normal individuals in endemic areas. *J Gen Virol* 1987;68:2853-62.
117. Tiwawech D, Srivatanakul P, Karalak A, Ishida T. Association between EBNA2 and LMP1 subtypes of Epstein-Barr virus and nasopharyngeal carcinoma in Thais. *J Clin Virol* 2008;42:1-6.
118. Miller WE, Edwards RH, Walling DM, Raab-Traub N. Sequence variation in the Epstein-Barr virus latent membrane protein 1. *J Gen Virol* 1994;75:2729-40.

119. Hu LF, Zabarovskiy ER, Chen F, et al. Isolation and sequencing of the Epstein-Barr virus BNLF-1 gene (LMP1) from a Chinese nasopharyngeal carcinoma. *J Gen Virol* 1991;72:2399-409.
120. Knecht H, Bachmann E, Brousset P, et al. Deletions within the LMP1 oncogene of Epstein-Barr virus are clustered in Hodgkin's disease and identical to those observed in nasopharyngeal carcinoma. *Blood* 1993;82:2937-42.
121. Ai JH, Xie ZD, Liu CY, Gao LW, Yan J. [Characteristic of nuclear antigen 1 gene and latent membrane protein 1 gene of Epstein-Barr virus in primary EBV infection in children in Beijing area in 2005-2010]. *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi* 2012;26:352-5.
122. Allen UD, Preiksaitis JK. Epstein-Barr virus and posttransplant lymphoproliferative disorder in solid organ transplantation. *Am J Transplant* 2013;13 Suppl 4:107-20.
123. Tsai DE, Douglas L, Andreadis C, et al. EBV PCR in the diagnosis and monitoring of posttransplant lymphoproliferative disorder: results of a two-arm prospective trial. *Am J Transplant* 2008;8:1016-24.
124. Rowe DT, Webber S, Schauer EM, Reyes J, Green M. Epstein-Barr virus load monitoring: its role in the prevention and management of post-transplant lymphoproliferative disease. *Transpl Infect Dis* 2001;3:79-87.
125. Ahmad I, Cau NV, Kwan J, et al. Preemptive management of Epstein-Barr virus reactivation after hematopoietic stem-cell transplantation. *Transplantation* 2009;87:1240-5.
126. Hakim H, Gibson C, Pan J, et al. Comparison of various blood compartments and reporting units for the detection and quantification of Epstein-Barr virus in peripheral blood. *J Clin Microbiol* 2007;45:2151-5.
127. Smets F, Latinne D, Bazin H, et al. Ratio between Epstein-Barr viral load and anti-Epstein-Barr virus specific T-cell response as a predictive marker of posttransplant lymphoproliferative disease. *Transplantation* 2002;73:1603-10.
128. Kroll J, Li S, Levi M, Weinberg A. Lytic and latent EBV gene expression in transplant recipients with and without post-transplant lymphoproliferative disorder. *J Clin Virol* 2011;52:231-5.
129. Ye F, Lei X, Gao SJ. Mechanisms of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Latency and Reactivation. *Adv Virol* 2011;2011. pii:193860. 193860.
130. Staskus KA, Zhong W, Gebhard K, et al. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus gene expression in endothelial (spindle) tumor cells. *J Virol* 1997;71:715-9.
131. Dittmer D, Lagunoff M, Renne R, et al. A cluster of latently expressed genes in Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *J Virol* 1998;72:8309-15.

132. McClure LV, Sullivan CS. Kaposi's sarcoma herpes virus taps into a host microRNA regulatory network. *Cell Host Microbe* 2008;3:1-3.
133. Purushothaman P, Dabral P, Gupta N, Sarkar R, Verma SC. KSHV Genome Replication and Maintenance. *Front Microbiol* 2016;7:54.
134. Yu Y, Black JB, Goldsmith CS, et al. Induction of human herpesvirus-8 DNA replication and transcription by butyrate and TPA in BCBL-1 cells. *J Gen Virol* 1999;80:83-90.
135. Iyengar S, Farnham PJ. KAP1 protein: an enigmatic master regulator of the genome. *J Biol Chem* 2011;286:26267-76.
136. Gradoville L, Gerlach J, Grogan E, et al. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus open reading frame 50/Rta protein activates the entire viral lytic cycle in the HH-B2 primary effusion lymphoma cell line. *J Virol* 2000;74:6207-12.
137. Jenner RG, Alba MM, Boshoff C, Kellam P. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus latent and lytic gene expression as revealed by DNA arrays. *J Virol* 2001;75:891-902.
138. Rossetto C, Gao Y, Yamboliev I, Papouskova I, Pari G. Transcriptional repression of K-Rta by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus K-bZIP is not required for oriLyt-dependent DNA replication. *Virology* 2007;369:340-50.
139. Verma D, Li DJ, Krueger B, Renne R, Swaminathan S. Identification of the physiological gene targets of the essential lytic replicative Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus ORF57 protein. *J Virol* 2015;89:1688-702.
140. Sadagopan S, Sharma-Walia N, Veettil MV, et al. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus induces sustained NF-kappaB activation during de novo infection of primary human dermal microvascular endothelial cells that is essential for viral gene expression. *J Virol* 2007;81:3949-68.
141. Ye FC, Blackbourn DJ, Mengel M, et al. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus promotes angiogenesis by inducing angiopoietin-2 expression via AP-1 and Ets1. *J Virol* 2007;81:3980-91.
142. Chang H, Dittmer DP, Shin YC, Hong Y, Jung JU. Role of Notch signal transduction in Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus gene expression. *J Virol* 2005;79:14371-82.
143. Katano H, Sato Y, Kurata T, Mori S, Sata T. Expression and localization of human herpesvirus 8-encoded proteins in primary effusion lymphoma, Kaposi's sarcoma, and multicentric Castleman's disease. *Virology* 2000;269:335-44.
144. Parravicini C, Chandran B, Corbellino M, et al. Differential viral protein expression in Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-infected diseases: Kaposi's sarcoma, primary effusion lymphoma, and multicentric Castleman's disease. *Am J Pathol* 2000;156:743-9.

145. Staskus KA, Sun R, Miller G, et al. Cellular tropism and viral interleukin-6 expression distinguish human herpesvirus 8 involvement in Kaposi's sarcoma, primary effusion lymphoma, and multicentric Castleman's disease. *J Virol* 1999;73:4181-7.
146. Burbelo PD, Issa AT, Ching KH, et al. Distinct profiles of antibodies to Kaposi sarcoma-associated herpesvirus antigens in patients with Kaposi sarcoma, multicentric Castleman disease, and primary effusion lymphoma. *J Infect Dis* 2010;201:1919-22.
147. Tedeschi R, Marus A, Bidoli E, Simonelli C, De Paoli P. Human herpesvirus 8 DNA quantification in matched plasma and PBMCs samples of patients with HHV8-related lymphoproliferative diseases. *J Clin Virol* 2008;43:255-9.
148. Haq IU, Dalla PA, Papanastasopoulos P, et al. The clinical application of plasma Kaposi sarcoma herpesvirus viral load as a tumour biomarker: results from 704 patients. *HIV Med* 2016;17:56-61.
149. Broccolo F, Tassan DC, Vigano MG, et al. HHV-8 DNA replication correlates with the clinical status in AIDS-related Kaposi's sarcoma. *J Clin Virol* 2016;78:47-52.
150. Guttman-Yassky E, Abada R, Kra-Oz Z, et al. Relationship between human herpesvirus 8 loads and disease stage in classic Kaposi sarcoma patients. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007;57:387-92.
151. Nugent DB, Webster D, Mabayoje D, et al. Use of plasma human herpesvirus-8 viral load measurement: evaluation of practice in three UK HIV treatment centres. *Int J STD AIDS* 2017;28:188-91.
152. Wang HW, Pittaluga S, Jaffe ES. Multicentric Castleman disease: Where are we now? *Semin Diagn Pathol* 2016;33:294-306.
153. Uldrick TS, Polizzotto MN, Yarchoan R. Recent advances in Kaposi sarcoma herpesvirus-associated multicentric Castleman disease. *Curr Opin Oncol* 2012;24:495-505.
154. Chadburn A, Hyjek EM, Tam W, et al. Immunophenotypic analysis of the Kaposi sarcoma herpesvirus (KSHV; HHV-8)-infected B cells in HIV+ multicentric Castleman disease (MCD). *Histopathology* 2008;53:513-24.
155. Du MQ, Liu H, Diss TC, et al. Kaposi sarcoma-associated herpesvirus infects monotypic (IgM lambda) but polyclonal naive B cells in Castleman disease and associated lymphoproliferative disorders. *Blood* 2001;97:2130-6.
156. Wakely PE, Jr., Menezes G, Nuovo GJ. Primary effusion lymphoma: cytopathologic diagnosis using in situ molecular genetic analysis for human herpesvirus 8. *Mod Pathol* 2002;15:944-50.
157. Hassman LM, Ellison TJ, Kedes DH. KSHV infects a subset of human tonsillar B cells, driving proliferation and plasmablast differentiation. *J Clin Invest* 2011;121:752-68.

158. Ballon G, Chen K, Perez R, Tam W, Cesarman E. Kaposi sarcoma herpesvirus (KSHV) vFLIP oncoprotein induces B cell transdifferentiation and tumorigenesis in mice. *J Clin Invest* 2011;121:1141-53.
159. Carbone A, De Paoli P, Gloghini A, Vaccher E. KSHV-associated multicentric Castleman disease: A tangle of different entities requiring multitarget treatment strategies. *Int J Cancer* 2015;137:251-61.
160. Fajgenbaum DC, van Rhee F, Nabel CS. HHV-8-negative, idiopathic multicentric Castleman disease: novel insights into biology, pathogenesis, and therapy. *Blood* 2014;123:2924-33.
161. Gerard L, Michot JM, Burcheri S, et al. Rituximab decreases the risk of lymphoma in patients with HIV-associated multicentric Castleman disease. *Blood* 2012;119:2228-33.
162. Koenig G, Stevens TM, Peker D. Plasmablastic microlymphoma arising in human herpesvirus-8-associated multicentric Castleman disease in a human immunodeficiency virus-seronegative patient with clinical response to anti-interleukin-6 therapy. *Histopathology* 2015;67:930-2.
163. Nagao A, Nakazawa S, Hanabusa H. Short-term efficacy of the IL6 receptor antibody tocilizumab in patients with HIV-associated multicentric Castleman disease: report of two cases. *J Hematol Oncol* 2014;7:10.
164. Nishimoto N, Kanakura Y, Aozasa K, et al. Humanized anti-interleukin-6 receptor antibody treatment of multicentric Castleman disease. *Blood* 2005;106:2627-32.
165. Uldrick TS, Polizzotto MN, Aleman K, et al. Rituximab plus liposomal doxorubicin in HIV-infected patients with KSHV-associated multicentric Castleman disease. *Blood* 2014;124:3544-52.
166. van Rhee F, Casper C, Voorhees PM, et al. A phase 2, open-label, multicenter study of the long-term safety of siltuximab (an anti-interleukin-6 monoclonal antibody) in patients with multicentric Castleman disease. *Oncotarget* 2015;6:30408-19.
167. Deisseroth A, Ko CW, Nie L, et al. FDA approval: siltuximab for the treatment of patients with multicentric Castleman disease. *Clin Cancer Res* 2015;21:950-4.
168. van Rhee F, Wong RS, Munshi N, et al. Siltuximab for multicentric Castleman's disease: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Oncol* 2014;15:966-74.
169. Dupin N, Diss TL, Kellam P, et al. HHV-8 is associated with a plasmablastic variant of Castleman disease that is linked to HHV-8-positive plasmablastic lymphoma. *Blood* 2000;95:1406-12.
170. Engels EA, Pittaluga S, Whitby D, et al. Immunoblastic lymphoma in persons with AIDS-associated Kaposi's sarcoma: a role for Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Mod Pathol* 2003;16:424-9.

171. Oksenhendler E, Boulanger E, Galicier L, et al. High incidence of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus-related non-Hodgkin lymphoma in patients with HIV infection and multicentric Castleman disease. *Blood* 2002;99:2331-6.
172. Green I, Espiritu E, Ladanyi M, et al. Primary lymphomatous effusions in AIDS: a morphological, immunophenotypic, and molecular study. *Mod Pathol* 1995;8:39-45.
173. Said JW, Tasaka T, Takeuchi S, et al. Primary effusion lymphoma in women: report of two cases of Kaposi's sarcoma herpes virus-associated effusion-based lymphoma in human immunodeficiency virus-negative women. *Blood* 1996;88:3124-8.
174. Teruya-Feldstein J, Zauber P, Setsuda JE, et al. Expression of human herpesvirus-8 oncogene and cytokine homologues in an HIV-seronegative patient with multicentric Castleman's disease and primary effusion lymphoma. *Lab Invest* 1998;78:1637-42.
175. Ghosh SK, Wood C, Boise LH, et al. Potentiation of TRAIL-induced apoptosis in primary effusion lymphoma through azidothymidine-mediated inhibition of NF-kappa B. *Blood* 2003;101:2321-7.
176. Du MQ, Diss TC, Liu H, et al. KSHV- and EBV-associated germinotropic lymphoproliferative disorder. *Blood* 2002;100:3415-8.
177. Bacha D, Chelly B, Kilani H, et al. HHV8/EBV Coinfection Lymphoproliferative Disorder: Rare Entity with a Favorable Outcome. *Case Rep Hematol* 2017;2017:1578429.
178. Bhavsar T, Lee JC, Perner Y, et al. KSHV-associated and EBV-associated Germinotropic Lymphoproliferative Disorder: New Findings and Review of the Literature. *Am J Surg Pathol* 2017;10.
179. Chadburn A, Said J, Gratzinger D, et al. HHV8/KSHV-Positive Lymphoproliferative Disorders and the Spectrum of Plasmablastic and Plasma Cell Neoplasms 2015 SH/EAHP Workshop Report Part 3. *American Journal of Clinical Pathology* 2017;147:171-87.
180. Courville EL, Sohani AR, Hasserjian RP, et al. Diverse clinicopathologic features in human herpesvirus 8-associated lymphomas lead to diagnostic problems. *Am J Clin Pathol* 2014;142:816-29.
181. D'Antonio A, Boscaino A, Adesso M, Piris MA, Nappi O. KSHV- and EBV-associated germinotropic lymphoproliferative disorder: a rare lymphoproliferative disease of HIV patient with plasmablastic morphology, indolent course and favourable response to therapy. *Leuk Lymphoma* 2007;48:1444-7.
182. D'Antonio A, Adesso M, Memoli D, et al. Lymph node-based disease and HHV-8/KSHV infection in HIV seronegative patients: report of three new cases of a heterogeneous group of diseases. *Int J Hematol* 2011;93:795-801.
183. Oh J, Yoon H, Shin DK, et al. A case of successful management of HHV-8(+), EBV(+) germinotropic lymphoproliferative disorder (GLD). *Int J Hematol* 2012;95:107-11.

184. Papoudou-Bai A, Hatzimichael E, Kyriazopoulou L, Briasoulis E, Kanavaros P. Rare variants in the spectrum of human herpesvirus 8/Epstein-Barr virus-copositive lymphoproliferations. *Hum Pathol* 2015;46:1566-71.
185. Seliem RM, Griffith RC, Harris NL, et al. HHV-8+, EBV+ multicentric plasmablastic microlymphoma in an HIV+ Man: the spectrum of HHV-8+ lymphoproliferative disorders expands. *Am J Surg Pathol* 2007;31:1439-45.
186. Taris M, de Mascarel A, Riols M, et al. [KHSV/EBV associated germinotropic lymphoproliferative disorder: a rare entity, case report and review of the literature]. *Ann Pathol* 2014;34:373-7.
187. Uldrick TS, Wang V, O'Mahony D, et al. An interleukin-6-related systemic inflammatory syndrome in patients co-infected with Kaposi sarcoma-associated herpesvirus and HIV but without Multicentric Castleman disease. *Clin Infect Dis* 2010;51:350-8.
188. Baumgarth N. A two-phase model of B-cell activation. *Immunol Rev* 2000;176:171-80.:171-80.
189. Knowles DM. Neoplastic hematopathology. Lippincott Williams & Wilkins; 2001.
190. Iwakoshi NN, Lee AH, Vallabhajosyula P, et al. Plasma cell differentiation and the unfolded protein response intersect at the transcription factor XBP-1. *Nat Immunol* 2003;4:321-9.
191. Gunn KE, Gifford NM, Mori K, Brewer JW. A role for the unfolded protein response in optimizing antibody secretion. *Mol Immunol* 2004;41:919-27.
192. Lee AH, Iwakoshi NN, Glimcher LH. XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response. *Mol Cell Biol* 2003;23:7448-59.
193. Tagliavacca L, Anelli T, Fagioli C, et al. The making of a professional secretory cell: architectural and functional changes in the ER during B lymphocyte plasma cell differentiation. *Biol Chem* 2003;384:1273-7.
194. Iwakoshi NN, Lee AH, Glimcher LH. The X-box binding protein-1 transcription factor is required for plasma cell differentiation and the unfolded protein response. *Immunol Rev* 2003;194:29-38.:29-38.
195. Balague O, Mozos A, Martinez D, et al. Activation of the endoplasmic reticulum stress-associated transcription factor x box-binding protein-1 occurs in a subset of normal germinal-center B cells and in aggressive B-cell lymphomas with prognostic implications. *Am J Pathol* 2009;174:2337-46.
196. Crawford DH, Ando I. EB virus induction is associated with B-cell maturation. *Immunology* 1986;59:405-9.

197. Bhende PM, Dickerson SJ, Sun X, Feng WH, Kenney SC. X-box-binding protein 1 activates lytic Epstein-Barr virus gene expression in combination with protein kinase D. *J Virol* 2007;81:7363-70.
198. Taylor GM, Raghuwanshi SK, Rowe DT, Wadowsky RM, Rosendorff A. Endoplasmic reticulum stress causes EBV lytic replication. *Blood* 2011;118:5528-39.
199. Raver RM, Panfil AR, Hagemeyer SR, Kenney SC. The B-cell-specific transcription factor and master regulator Pax5 promotes Epstein-Barr virus latency by negatively regulating the viral immediate early protein BZLF1. *J Virol* 2013;87:8053-63.
200. Robinson AR, Kwek SS, Kenney SC. The B-cell specific transcription factor, Oct-2, promotes Epstein-Barr virus latency by inhibiting the viral immediate-early protein, BZLF1. *PLoS Pathog* 2012;8:e1002516.
201. Wilson SJ, Tsao EH, Webb BL, et al. X box binding protein XBP-1s transactivates the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) ORF50 promoter, linking plasma cell differentiation to KSHV reactivation from latency. *J Virol* 2007;81:13578-86.
202. Yu F, Feng J, Harada JN, et al. B cell terminal differentiation factor XBP-1 induces reactivation of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *FEBS Lett* 2007;581:3485-8.
203. Hu D, Wang V, Yang M, et al. Induction of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus-Encoded Viral Interleukin-6 by X-Box Binding Protein 1. *J Virol* 2015;90:368-78.
204. Chen D, Sandford G, Nicholas J. Intracellular signaling mechanisms and activities of human herpesvirus 8 interleukin-6. *J Virol* 2009;83:722-33.
205. Leblond V, Davi F, Charlotte F, et al. Posttransplant lymphoproliferative disorders not associated with Epstein-Barr virus: a distinct entity? *J Clin Oncol* 1998;16:2052-9.
206. Caillard S, Lelong C, Pessione F, Moulin B. Post-transplant lymphoproliferative disorders occurring after renal transplantation in adults: report of 230 cases from the French Registry. *Am J Transplant* 2006;6:2735-42.
207. Harwood JS, Gould FK, McMaster A, et al. Significance of Epstein-Barr virus status and post-transplant lymphoproliferative disease in pediatric thoracic transplantation. *Pediatr Transplant* 1999;3:100-3.
208. Webber SA. Post-transplant lymphoproliferative disorders: a preventable complication of solid organ transplantation? *Pediatr Transplant* 1999;3:95-9.
209. Chinnock R, Webber SA, Dipchand AI, Brown RN, George JF. A 16-year multi-institutional study of the role of age and EBV status on PTLTD incidence among pediatric heart transplant recipients. *Am J Transplant* 2012;12:3061-8.
210. Funch DP, Walker AM, Schneider G, Ziyadeh NJ, Pescovitz MD. Ganciclovir and acyclovir reduce the risk of post-transplant lymphoproliferative disorder in renal transplant recipients. *Am J Transplant* 2005;5:2894-900.

211. Hocker B, Bohm S, Fickenscher H, et al. (Val-)Ganciclovir prophylaxis reduces Epstein-Barr virus primary infection in pediatric renal transplantation. *Transpl Int* 2012;25:723-31.
212. Young LS. Epstein-Barr-virus infection and persistence: a B-cell marriage in sickness and in health. *Lancet* 1999;354:1141-2.
213. Hong GK, Gulley ML, Feng WH, et al. Epstein-Barr virus lytic infection contributes to lymphoproliferative disease in a SCID mouse model. *J Virol* 2005;79:13993-4003.
214. Sairenji T, Katsuki T, Hinuma Y. Cell-killing by Epstein-Barr virus: analysis by colony inhibition procedure. *Int J Cancer* 1976;17:389-95.
215. Pappworth IY, Wang EC, Rowe M. The switch from latent to productive infection in Epstein-Barr virus-infected B cells is associated with sensitization to NK cell killing. *J Virol* 2007;81:474-82.
216. Blazar B, Patarroyo M, Klein E, Klein G. Increased sensitivity of human lymphoid lines to natural killer cells after induction of the Epstein-Barr viral cycle by superinfection or sodium butyrate. *J Exp Med* 1980;151:614-27.
217. McDonald C, Karstegl CE, Kellam P, Farrell PJ. Regulation of the Epstein-Barr virus Zp promoter in B lymphocytes during reactivation from latency. *J Gen Virol* 2010;91:622-9.
218. Young LS, Rickinson AB. Epstein-Barr virus: 40 years on. *Nat Rev Cancer* 2004;4:757-68.
219. Nagy N, Adori M, Rasul A, et al. Soluble factors produced by activated CD4+ T cells modulate EBV latency. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109:1512-7.
220. Rasul AE, Nagy N, Sohlberg E, et al. Simultaneous detection of the two main proliferation driving EBV encoded proteins, EBNA-2 and LMP-1 in single B cells. *J Immunol Methods* 2012;385:60-70.
221. Vajro P, Lucariello S, Migliaro F, et al. Predictive value of Epstein-Barr virus genome copy number and BZLF1 expression in blood lymphocytes of transplant recipients at risk for lymphoproliferative disease. *J Infect Dis* 2000;181:2050-4.
222. Gotoh K, Ito Y, Maruo S, et al. Replication of Epstein-Barr virus primary infection in human tonsil tissue explants. *PLoS One* 2011;6:e25490.
223. Daibata M, Bandobashi K, Kuroda M, et al. Induction of lytic Epstein-Barr virus (EBV) infection by synergistic action of rituximab and dexamethasone renders EBV-positive lymphoma cells more susceptible to ganciclovir cytotoxicity in vitro and in vivo. *J Virol* 2005;79:5875-9.
224. Meng Q, Hagemeyer SR, Fingerroth JD, et al. The Epstein-Barr virus (EBV)-encoded protein kinase, EBV-PK, but not the thymidine kinase (EBV-TK), is required for ganciclovir and acyclovir inhibition of lytic viral production. *J Virol* 2010;84:4534-42.

225. Aris RM, Maia DM, Neuringer IP, et al. Post-transplantation lymphoproliferative disorder in the Epstein-Barr virus-naive lung transplant recipient. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;154:1712-7.
226. Kuo PC, Dafoe DC, Alfrey EJ, Sibley RK, Scandling JD. Posttransplant lymphoproliferative disorders and Epstein-Barr virus prophylaxis. *Transplantation* 1995;59:135-8.
227. Trappe RU, Choquet S, Dierickx D, et al. International prognostic index, type of transplant and response to rituximab are key parameters to tailor treatment in adults with CD20-positive B cell PTL: clues from the PTL-1 trial. *Am J Transplant* 2015;15:1091-100.
228. Ling SC, Lau EK, Al Shabeeb A, et al. Response of myeloma to the proteasome inhibitor bortezomib is correlated with the unfolded protein response regulator XBP-1. *Haematologica* 2012;97:64-72.
229. Mozos A, Roue G, Lopez-Guillermo A, et al. The expression of the endoplasmic reticulum stress sensor BiP/GRP78 predicts response to chemotherapy and determines the efficacy of proteasome inhibitors in diffuse large b-cell lymphoma. *Am J Pathol* 2011;179:2601-10.
230. Reid EG. Bortezomib-induced Epstein-Barr virus and Kaposi sarcoma herpesvirus lytic gene expression: oncolytic strategies. *Curr Opin Oncol* 2011;23:482-7.
231. Gonzalez-Farre B, Rovira J, Martinez D, et al. In vivo intratumoral Epstein-Barr virus replication is associated with XBP1 activation and early-onset post-transplant lymphoproliferative disorders with prognostic implications. *Mod Pathol* 2014;27:1599-611.
232. Polizzotto MN, Uldrick TS, Hu D, Yarchoan R. Clinical Manifestations of Kaposi Sarcoma Herpesvirus Lytic Activation: Multicentric Castleman Disease (KSHV-MCD) and the KSHV Inflammatory Cytokine Syndrome. *Front Microbiol* 2012;3:73.
233. Polizzotto MN, Uldrick TS, Wang V, et al. Human and viral interleukin-6 and other cytokines in Kaposi sarcoma herpesvirus-associated multicentric Castleman disease. *Blood* 2013;122:4189-98.
234. Schulte KM, Talat N. Castleman's disease--a two compartment model of HHV8 infection. *Nat Rev Clin Oncol* 2010;7:533-43.
235. El Daly H, Bower M, Naresh KN. Follicular dendritic cells in multicentric Castleman disease present human herpes virus type 8 (HHV8)-latent nuclear antigen 1 (LANA1) in a proportion of cases and is associated with an enhanced T-cell response. *Eur J Haematol* 2010;84:133-6.
236. Hensler HR, Rappocciolo G, Rinaldo CR, Jenkins FJ. Cytokine production by human herpesvirus 8-infected dendritic cells. *J Gen Virol* 2009;90:79-83.

237. Campbell DM, Rappocciolo G, Jenkins FJ, Rinaldo CR. Dendritic cells: key players in human herpesvirus 8 infection and pathogenesis. *Front Microbiol* 2014;5:452.
238. Rappocciolo G, Jenkins FJ, Hensler HR, et al. DC-SIGN is a receptor for human herpesvirus 8 on dendritic cells and macrophages. *J Immunol* 2006;176:1741-9.
239. Taruishi M, Terashima K, Dewan Z, et al. Role of follicular dendritic cells in the early HIV-1 infection: in vitro model without specific antibody. *Microbiol Immunol* 2004;48:693-702.
240. Beaty MW, Kumar S, Sorbara L, et al. A biophenotypic human herpesvirus 8--associated primary bowel lymphoma. *Am J Surg Pathol* 1999;23:992-4.
241. Ely SA, Powers J, Lewis D, et al. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-positive primary effusion lymphoma arising in the subarachnoid space. *Hum Pathol* 1999;30:981-4.
242. Jain S, Palekar A, Monaco SE, et al. Human Immunodeficiency Virus-associated primary effusion lymphoma: An exceedingly rare entity in cerebrospinal fluid. *Cytojournal* 2015;12:22.